

# RNA 干渉に関わる 新規機能性核酸の創製

2014 年 3 月

伊田 寛之



# 目次

## 第 1 章 序論

1-1	はじめに	2
1-2	microRNA	2
1-3	miRNA の生合成および作用機構	2
1-4	miRNA とがん	4
1-5	miRNA inhibitor	6
1-6	small interfering RNA	6
1-7	本研究の目的と概要	8
1-8	参考文献	9

## 第 2 章 非修飾 DNA を用いた miRNA inhibitor

2-1	緒言	14
2-2	材料と方法	
	2-2-1. 細胞培養	15
	2-2-2. LidNA の形成	15
	2-2-3. レポータージーンアッセイ	15
2-3	結果と考察	
	2-3-1. 非修飾 DNA を用いた miRNA inhibitor の設計	20
	2-3-2. LidNA の構造と活性との関係	22
2-4	参考文献	25

## 第 3 章 LidNA の miRNA 阻害機構の解明

3-1	緒言	28
3-2	材料と方法	
	3-2-1. オリゴヌクレオチド間の相互作用解析	28
	3-2-2. 蛍光偏光解析	29
3-3	結果と考察	
	3-3-1. オリゴヌクレオチド間結合に対する 2 本鎖領域の影響	29
	3-3-2. 蛍光偏光解析による miRNA binding site の安定性の評価	33
3-4	参考文献	35

## 第4章 DNA パッセンジャー鎖の延長による RNA/DNA ハイブリッド siRNA の高活性化

4-1	緒言	38
4-2	材料と方法	
4-2-1.	細胞培養	38
4-2-2.	siRNA と HsiRNA の調製	39
4-2-3.	レポータージーンアッセイ	39
4-2-4.	qRT-PCR による IFN $\beta$ 、IP-10、OAS1 mRNA の定量	40
4-3	結果と考察	
4-3-1.	HsiRNA の末端構造と活性の関係	40
4-3-2.	Grich 配列の付加による RNAi 活性の向上	45
4-3-3.	GFP に対する延長型 HsiRNA	48
4-3-4.	延長型 HsiRNA のインターフェロン応答性	46
4-4	参考文献	53

## 第5章 腫瘍抑制能を有する miRNA、miR-143 の高活性化

5-1	緒言	56
5-2	材料と方法	
5-2-1.	細胞培養	56
5-2-2.	miRNA の調製	56
5-2-3.	レポータージーンアッセイ	57
5-2-4.	細胞増殖測定	57
5-3	結果	
5-3-1.	Hetero miRNA の作製と活性	58
5-3-2.	延長領域の付加による HmiR-143 の高活性化	59
5-3-3.	延長領域の付加による miR-143 の高活性化	63
5-3-4.	キメラ延長型 miR-143 のがん細胞増殖抑制効果	64
5-4	考察	67
5-5	参考文献	70

第 6 章	pre-miRNA を標的とした siRNA によるがん選択的増殖抑制	
6-1	緒言	74
6-2	材料と方法	
	6-2-1. 細胞培養	75
	6-2-2. siRNA の調製	75
	6-2-3. pre-miRNA および mature miRNA の定量	75
	6-2-4. 細胞増殖測定	76
	6-2-5. レポータージーンアッセイ	76
6-4	結果と考察	
	6-3-1. pre-miR-21 のノックダウンによるがん細胞増殖抑制	77
	6-3-2. 延長型 si-pre21 による高効率ながん細胞増殖抑制	79
	参考文献	82
	総括	85
	論文目録	87
	謝辞	89

## 本論文中で使用する略語

3'-UTR	3'非翻訳領域
Ago2	Argonaute2
HsiRNA	hetero siRNA
IFN $\beta$	Interferon beta
IP-10	Interferon gamma-induced protein 10
LNA	locked nucleic acid
miRNA	microRNA
OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1
pre-miRNA	precursor miRNA
pri-miRNA	primary miRNA
RISC	RNA induced silencing complex
siRNA	small interfering RNA
TLR3	Toll-like receptor 3

# 第 1 章

## 序論

## 1-1. はじめに

1953年にワトソン・クリックにより DNA の二重らせん構造が解明され<sup>(1)</sup>、分子レベルで遺伝の仕組みが明らかにされた。1970 代後半になり DNA を解析、加工する技術いわゆる遺伝子工学技術が発展し、急速に生物の遺伝情報に関する知見が蓄えられてきた。2003 年にはヒトゲノム計画が完了し、ヒトの染色体を構成する全 DNA 配列が明らかにされた<sup>(2)</sup>。ヒトゲノム計画終了時の報告では、ヒトの全ゲノム配列の中で遺伝子と呼ばれる領域は約 2% に過ぎないとされ、それ以外の領域は生命活動の維持に必要なではないジャンク DNA であると考えられていた。しかし、2007 年から始まった ENCODE プロジェクトの成果により、遺伝子配列を持たない領域からも膨大な数の RNA が転写されていることが明らかになった<sup>(3)</sup>。これらの RNA には大小様々なものが含まれているが、それらの多くが特有の機能を有し遺伝子の発現調節を担っている。現在では、全ゲノム配列の 80% 以上が生命活動の維持に関わっているとされている。

前述した機能性の RNA は、非タンパク質コード領域より転写されることから non-coding RNA (ncRNA) と呼ばれている。X 染色体の不活性化に関わる Xist RNA<sup>(4)</sup>、RNA スプライシングに関わる small nuclear RNA (snRNA)<sup>(5)</sup>などが良く知られているが、特に注目を集めているものとして本論文の研究対象である microRNA (miRNA) が挙げられる。

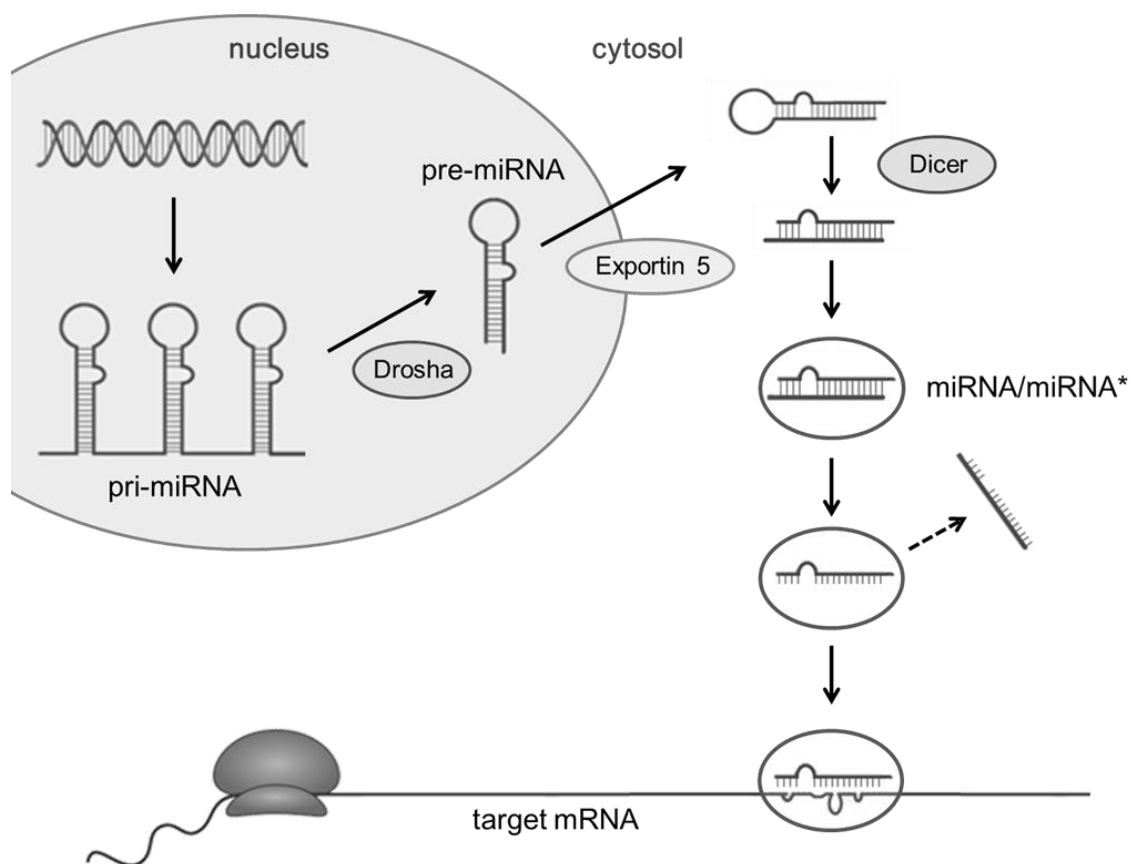
## 1-2. microRNA

miRNA の存在が初めて示唆されたのは 1993 年のことである。Lee らは、線虫において Lin-4 をコードする mRNA に結合し、翻訳抑制を行う small RNA が存在することを報告した<sup>(6)</sup>。しばらくの間このような small RNA に関する研究は報告されなかったが、2000 年に Pasquinelli らが、哺乳類を含めた線虫以外の生物種においても Lee らの発見した small RNA が保存されていることを明らかにしたことで、急激に miRNA に関する研究が進められた<sup>(7)</sup>。これまでの研究で、ヒトにおいては 1000 種類前後の miRNA が同定されており、それぞれが生体内における多くの重要な機能に関わっていることが明らかになっている。また、miRNA は 18 - 25 塩基の 1 本鎖 RNA であること、ヒト遺伝子の 3 分の 1 以上は何らかの miRNA によって制御されていることなどが次第に分かってきた<sup>(8)</sup>。

## 1-3. miRNA の生合成および作用機構

この項では、前駆体として転写された miRNA が数段階のプロセッシングを受けることにより成熟化する経路および、成熟化した miRNA が標的とする遺伝子の発現を阻害する機構に関して述べる。Fig 1-1 に示すように、miRNA は RNA ポリメラーゼ II によって、複数のステムループ構造を含む 1000 - 3000 塩基長の 1 本鎖 RNA である primary miRNA (pri-miRNA) として転写される<sup>(9)</sup>。そして RNase III ファミリーに属する Drosha によって核内で切断され、





**Fig 1-1. miRNA の生合成経路**

miRNA は RNA ポリメラーゼ II によって、1000 – 3000 塩基長の 1 本鎖 RNA である pri-miRNA として転写される。pri-miRNA が Drosha によって切断されることで、70 – 100 塩基長の pre-miRNA が生成される。pre-miRNA は Exportin 5 によって核内から細胞質へと運び出され、Dicer による切断を受け miRNA/miRNA\*2 本鎖となる。miRNA/miRNA\*2 本鎖は RISC と呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれ、unwinding と呼ばれる機構によって miRNA\*鎖が放出される。miRNA-RISC 複合体は標的となる mRNA に結合し、タンパク質の翻訳抑制を行う。

70 - 100 塩基長程度のステムループ型構造をもつ precursor miRNA (pre-miRNA) となる<sup>(10)</sup>。その後、核外輸送タンパク質である Exportin 5<sup>(11, 12)</sup>によって細胞質へと運び込まれた pre-miRNA は、Drosha と同じく RNase IIIファミリーに属する Dicer によって再び切断され、18 - 25 塩基長の 2 本鎖 RNA 構造をもつ miRNA/miRNA\*2 本鎖(mature miRNA)となる<sup>(13, 14)</sup>。

2 段階の切断過程を経て生成された mature miRNA は、RNA induced silencing complex (RISC) と呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれる<sup>(15)</sup>。そして、RISC 内で unwinding と呼ばれる反応が起こり mature miRNA の片側の鎖が取り除かれ RISC が成熟する。この際に RISC に残る鎖の割合は 2 本鎖 RNA の熱力学安定性に依存し、miRNA の種類によって大きく異なる。一般的に、より多く取り込まれる鎖を miRNA 鎖、取り込み量の少ない鎖を miRNA\*鎖と呼んでいる。稀に 2 本鎖の取り込み量が均等に近い miRNA に対しては、基と

なった pre-miRNA 内での位置関係から miRNA-#5p または miRNA-#3p と表記される<sup>(16)</sup>。

成熟 RISC に残った miRNA は相動性を有する標的 mRNA に結合する。ほとんどの場合、mRNA の 3'-非翻訳領域(3'-UTR)に存在する配列が miRNA の標的となる<sup>(17)</sup>。この際に非常に重要になるのが、シード配列と呼ばれる miRNA 鎖の 5'末端から 2-8 番目の塩基配列である<sup>(18)</sup>。RISC-miRNA 複合体はシード配列と相補性の高い配列をもつ mRNA に選択的に結合し、RNA 干渉と呼ばれるタンパク質の翻訳抑制を行う。RNA 干渉の機構については未知な点が多いが、miRNA の標的 mRNA への結合様式によって大きく 2 つに分かれるとされている。1 つは miRNA と mRNA が、ほぼ全ての塩基間で水素結合を形成した状態に起こる mRNA の分解機構である<sup>(19)</sup>。これは RISC の主要構成タンパク質である Argonaute2 (Ago2)の働きによるものであり、miRNA の 5'末端から 10 番目と 11 番目の塩基に対応する部位で mRNA を切断する。一方、miRNA-mRNA 間の上記した切断部位にミスマッチがある場合は Ago2 による分解反応は起こらず、異なった翻訳抑制機構が働く<sup>(20)</sup>。これらの作用機構に関する知見は未だ十分に得られていないが、翻訳開始因子のキャップ構造認識阻害や polyA 尾部の分解による mRNA の不安定化など、複数の経路によりタンパク質の生成を抑制していると考えられている。後者の機構が存在することにより、miRNA はシード配列さえ一致すれば結合した mRNA に対して翻訳抑制を行うことが出来る。そのため 1 種類の miRNA が多数の mRNA を標的とすることが可能となり、1 種類の miRNA は平均 200 種類の mRNA に対して翻訳抑制を行っていると考えられている<sup>(21, 22)</sup>。

## 1-4. miRNA とがん

miRNA の中には、細胞組織の恒常性維持に深く関わるものが多数含まれており、これらの異常発現は様々な疾患を引き起こす原因となる<sup>(22)</sup>。2000 年代半ばから、マイクロアレイや次世代シーケンサーを用いて miRNA プロファイリングを行った研究が多数行われ、がん組織と正常組織では miRNA の発現パターンが大きく異なることが明らかになった<sup>(23)</sup>。さらに、がんの種類によって急激に発現が増加または減少する miRNA が特定されており、がん治療薬の標的因子、もしくは診断のためのバイオマーカーとしても注目されている<sup>(24, 25)</sup>。

現在考えられている miRNA を利用した治療法は大きく 2 つに分けられる。1 つは、がん細胞で特異的に減少している miRNA を外部から補充する方法である。例えば、Kota らは肝がん組織において miR-26 の発現量が著しく低下していることを明らかにし、これを肝がんモデルマウスに導入することにより腫瘍の増殖が抑制されることを報告した<sup>(26)</sup>。また、Takeshita らは前立腺がんの細胞株で miR-16 の発現量が著しく低下していることを見出し、これを前立腺がんの骨転移モデルマウスに導入したところ、がんの骨転移が有意に抑制されることを明らかにしている<sup>(27)</sup>。もう一方の治療法は、がん細胞で高発現している miRNA の機能阻害によるものである。がんの形成・維持に関わる miRNA で最も有名なものは miR-21 である。この miRNA は、ほぼ全ての固形がん種において高発現していることが明ら

かになっている<sup>(28)</sup>。後述する miRNA inhibitor を用いた miR-21 の機能阻害は非常に有効な手法であり、様々ながんに対する増殖抑制効果が確認されている<sup>(29,30)</sup>。例えば Yan らは、miR-21 に対する miRNA inhibitor を用いることでマウス生体内における乳がん細胞の増殖を抑制した。

miRNA を標的とした治療方法は多くのがんに有効であると同時に、がん選択的に増殖抑制を誘導できるため、極めて副作用が少ない手法であると考えられている。すでに miRNA 医薬品に関する臨床試験が活発に行われており、近い将来、画期的な新薬として多くの miRNA 医薬品が開発されると思われる<sup>(31)</sup>。

**Table 1-1.** 各種がんで発現に変化が見られる miRNA<sup>(24)</sup>

がんの種類	発現上昇 miRNAs	発現低下 miRNAs
脳腫瘍	miR-21, 221	miR-128, 181
乳がん	miR-9-1, 10b, 17-5p, 21, 29b-2, 34, 146, 155, 181b-1, 213	let-7, miR-15a, 16, 125a, 125b, 127, 145, 204
肺がん	miR-17-5p, 17-92, 21, 24-2, 106a, 128b, 146, 150, 155, 191, 192, 197, 199a-1, 203, 205, 210, 212, 214	let-7, miR-9, 26a-1, 27b, 29b-2, 32, 33, 30a-5p, 95, 101-1, 124, 125a, 126, 140, 143, 145, 181, 198, 192, 199b, 216, 218-2, 219-1, 220, 224
食道がん	miR-21, 93	miR-203, 205
胃がん	miR-21, 24-1, 24-2, 25, 92-2, 107, 191, 214, 221, 223	let-7
結腸直腸がん	miR-17-5p, 20a, 21, 24-1, 24-2, 29b-2, 30c, 31, 32, 96, 106a, 107, 128b, 135b, 155, 183, 191, 221, 223	let-7, miR-34, 127, 133b, 143, 145
肝がん	miR-15b, 18a, 21, 106b, 221, 222, 224	let-7, miR-101, 122a, 125a, 195, 199a, 200a
膵臓がん	miR-17-5p, 20a, 21, 24-1, 24-2, 25, 29b-2, 30c, 32, 92-2, 100, 106a, 107, 125b, 128b, 146, 155, 181a, 181b-1, 191, 196a, 196b, 199a-1, 212, 214, 221, 223, 301, 376a	miR-139, 142, 345, 375
前立腺がん	miR-17-5p, 20a, 21, 25, 30c, 32, 92-2, 106a, 146, 181b-1, 191, 199a-1, 214, 223	miR-15a, 16, 143, 145, 218-2
子宮頸がん	miR-21, 199a	miR-143, 145

## 1-5. miRNA inhibitor

miRNA 鎖に対するアンチセンス核酸を総称して miRNA inhibitor と呼んでいる。現在最もよく使用されている miRNA inhibitor は locked nucleic acid (LNA) や 2'-O-methyl RNA (2'OMe) などの化学修飾核酸を用いて化学合成されたものである<sup>(32-34)</sup> (Fig 1-2)。これら化学修飾核酸は非修飾の DNA および RNA よりも高い 2 本鎖形成能をもつことが知られている<sup>(33)</sup>。そのため、これらを用いて合成した化学修飾 miRNA inhibitor を細胞内に導入すると、細胞内での miRNA-mRNA 間の結合を競合的に阻害することが出来る。またベクターを利用し、miRNA inhibitor を内在的に強制発現させる手法も開発が進んでいる<sup>(35)</sup>。すでに基礎研究ツールとして販売されているものもあり、例えば Genecopoeia 社の miArrest、Takara 社の TuD RNA などが知られている。どちらの手法も培養細胞に対する実験では有効に利用されている。しかし薬剤として応用する場合には、組織への送達の容易さから化学修飾 miRNA inhibitor の方が有効であると考えられる。

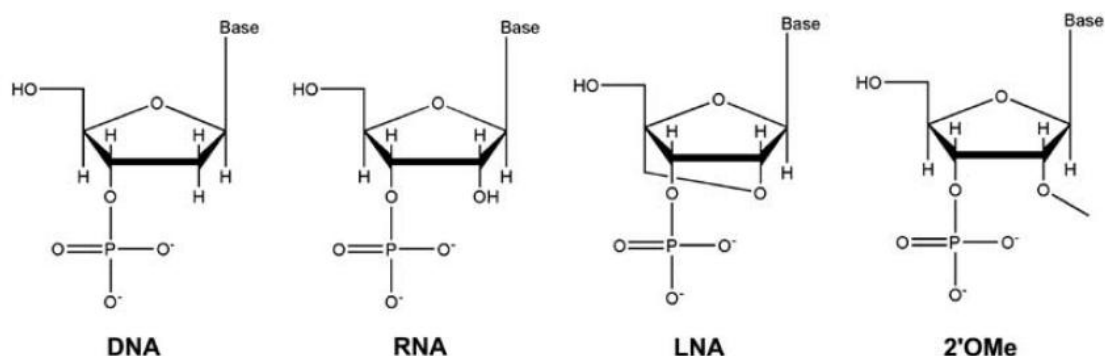


Fig 1-2. DNA、RNA、LNA、2'OMe の構造<sup>(33)</sup>

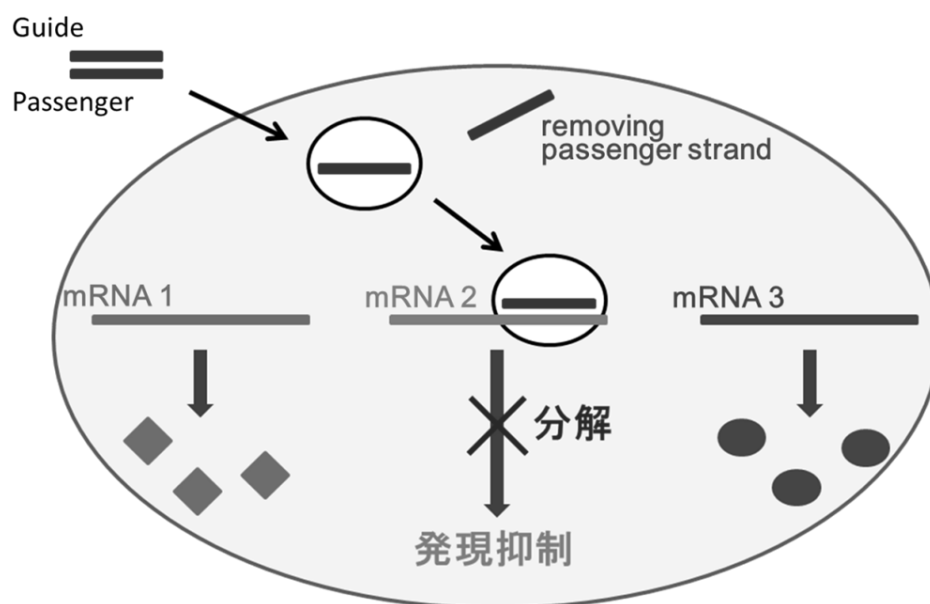
非修飾核酸である DNA および RNA、修飾核酸である LNA および 2'OMe の構造を示した。

## 1-6. small interfering RNA

RISC を介した mRNA 分解機構は非常に感度が良いため、この機構を応用した標的 mRNA 選択的な分解法が開発され幅広い分野で使用されている。前述したように miRNA が標的 mRNA に対してフルマッチに結合した場合、その mRNA は Ago2 のはたらきによって速やかに分解される<sup>(19)</sup>。この機構を利用し目的の mRNA だけを特異的に分解するために用いられるのが small interfering RNA (siRNA) である。siRNA は人工的に合成される 19 - 25 塩基対の短鎖 2 本鎖 RNA であり、細胞内に導入されると miRNA と同様の RISC を介した RNA 干渉を誘導する<sup>(36)</sup>。siRNA を構成する RNA 鎖は、それぞれガイド鎖とパッセンジャー鎖と呼ばれている。ガイド鎖は標的 mRNA に対して相補的な配列を持つように設計され、パッセンジャー鎖はガイド鎖に完全に相補的に結合するように設計される<sup>(36)</sup>。細胞内に siRNA2

本鎖を導入すると miRNA 経路と同様に RISC に取り込まれ、siRNA の 1 本鎖化が行われる。その後、ガイド鎖-RISC 複合体は標的となる mRNA に選択的に認識し分解を行うことにより、対応するタンパク質の産生を選択的に阻害する。

siRNA を用いた遺伝子ノックダウン法は極めて感度が良く、しかも比較的簡単に行える手法であるため、すでに生物学実験における基礎技術として認知されている。また医療の面においても、抗体医薬とならんで次世代の分子標的薬として期待を集めている。加えて、抗体医薬含め既存のバイオ医薬は、微生物もしくは高等生物由来の細胞を用いた大型培養により調製されるが、siRNA は化学合成によって調製できるため、迅速かつ安定的に供給することが可能である。siRNA 医薬品は、miRNA 医薬品と同様に今後ますます研究が進んでいくと期待されている。



**Fig 1-3.** siRNA 作用機構の簡略図

ガイド鎖とパッセンジャー鎖から成る siRNA は、RISC に取り込まれた後にパッセンジャー鎖が取り除かれガイド鎖だけが RISC に保持される。ガイド鎖-RISC 複合体は標的 mRNA に結合し、RISC の主要タンパク質である Ago2 の働きによって mRNA を分解する。

## 1-7. 本研究の目的と概要

これまで述べてきたように細胞内における RNA 干渉経路に関する研究は、がんを初めとする様々な疾患に対する理解を飛躍的に深め、画期的な治療薬の創出につながる。RNA 干渉の経路を標的とした様々な新薬候補が次々に生み出されている中、本研究では、独自の技術を活かした新たな核酸医薬の創製を目指した。

第2章では、新しい miRNA inhibitor である LidNA の開発について述べる。LidNA は非修飾 DNA を用いて作られた世界で初めての miRNA inhibitor である。第3章では表面プラズモン共鳴および蛍光偏光の技術を用いて、LidNA の結合機構を解明したことについて述べる。第4章では RNA と DNA からなる hetero siRNA の開発について述べる。第5章においては第4章で得られた知見を基に高活性型 miRNA を作製したことについて述べる。第6章では pre-miRNA のノックダウンによる新しい miRNA の機能阻害法について述べる。最後に本研究全体について総括を行い今後の展望を述べる。

## 1-8. 参考文献

1. **Watson, J. D. and Crick, F. H.:** Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171**, 737-738 (1953).
2. **International Human Genome Sequencing Consortium:** Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, **431**, 931-945 (2004).
3. **Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., and other 75 authors:** Landscape of transcription in human cells. *Nature*, **489**, 101-108 (2012).
4. **Jonkers, I., Monkhorst, K., Rentmeester, E., Grootegoed, J. A., Grosveld, F., and Gribnau, J.:** Xist RNA is confined to the nuclear territory of the silenced X chromosome throughout the cell cycle. *Mol Cell Biol*, **28**, 5583-5594 (2008).
5. **Wahl, M. C., Will, C. L., and Luhrmann, R.:** The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, **136**, 701-718 (2009).
6. **Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V.:** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843-854 (1993).
7. **Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degnan, B., Muller, P., and other 9 authors:** Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, **408**, 86-89 (2000).
8. **Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., and Bradley, A.:** Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, **14**, 1902-1910 (2004).
9. **Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N.:** MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, **23**, 4051-4060 (2004).
10. **Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N.:** The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **425**, 415-419 (2003).
11. **Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R.:** Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, **17**, 3011-3016 (2003).
12. **Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., and Kutay, U.:** Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, **303**, 95-98 (2004).
13. **Tsutsumi, A., Kawamata, T., Izumi, N., Seitz, H., and Tomari, Y.:** Recognition of the pre-miRNA structure by *Drosophila* Dicer-1. *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 1153-1158 (2011).
14. **Feng, Y., Zhang, X., Graves, P., and Zeng, Y.:** A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer. *RNA*, **18**, 2083-2092 (2012).

15. **Kawamata, T. and Tomari, Y.:** Making RISC. *Trends Biochem Sci*, **35**, 368-376 (2010).
16. **Guo, L. and Lu, Z.:** The fate of miRNA\* strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? *PLoS One*, **5**, e11387 (2010).
17. **Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., and Burge, C. B.:** Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, **115**, 787-798 (2003).
18. **Bartel, D. P.:** MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, **136**, 215-233 (2009).
19. **Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G. J.:** Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, **305**, 1437-1441 (2004).
20. **Kwak, P. B., Iwasaki, S., and Tomari, Y.:** The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci*, **101**, 2309-2315 (2010).
21. **Didiano, D. and Hobert, O.:** Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 849-851 (2006).
22. **Esquela-Kerscher, A. and Slack, F. J.:** Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 259-269 (2006).
23. **Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., and 8 authors:** A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2257-2261 (2006).
24. **Osakai, M., Takeshita, F., Ochiya, T.:** MicroRNAs as biomarkers and therapeutic drugs in human cancer. *Biomarkers*, **13**, 659-670 (2008).
25. **Jeffrey, S. S.:** Cancer biomarker profiling with microRNAs. *Nat Biotechnol*, **26**, 400-401 (2008).
26. **Kota, J., Chivukula, R. R., O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Montgomery, C. L., Hwang, H. W., Chang, T. C., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K. R., and other 2 authors:** Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*, **137**, 1005-1017 (2009).
27. **Takeshita, F., Patrawala, L., Osaki, M., Takahashi, R. U., Yamamoto, Y., Kosaka, N., Kawamata, M., Kelnar, K., Bader, A. G., Brown, D., and other 1 author:** Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther*, **18**, 181-187 (2010).
28. **Buscaglia, L. E. and Li, Y.:** Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin J Cancer*, **30**, 371-380 (2011).



29. **Zhou, X., Ren, Y., Moore, L., Mei, M., You, Y., Xu, P., Wang, B., Wang, G., Jia, Z., Pu, P., and other 2 authors:** Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status. *Lab Invest*, **90**, 144-155 (2010).
30. **Yan, L. X., Wu, Q. N., Zhang, Y., Li, Y. Y., Liao, D. Z., Hou, J. H., Fu, J., Zeng, M. S., Yun, J. P., Wu, Q. L., Zeng, Y. X., and Shao, J. Y.:** Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth. *Breast Cancer Res*, **13**, R2 (2011).
31. **Hydbring, P. and Badalian-Very, G.:** Clinical applications of microRNAs. *F1000Research*, **2**, 136 (2013)
32. **Hutvagner, G., Simard, M. J., Mello, C. C., and Zamore, P. D.:** Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol*, **2**, E98 (2004).
33. **Elmen, J., Lindow, M., Schutz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjarn, M., Hansen, H. F., Berger, U., and other 5 authors:** LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*, **452**, 896-899 (2008).
34. **Lennox, K. A. and Behlke, M. A.:** Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides. *Gene Ther*, **18**, 1111-1120 (2011).
35. **Haraguchi, T., Ozaki, Y., and Iba, H.:** Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, **37**, e43 (2009).
36. **Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C.:** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811 (1998).
37. **Naito, Y., Yoshimura, J., Morishita, S., and Ui-Tei, K.:** siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics*, **10**, 392 (2009).



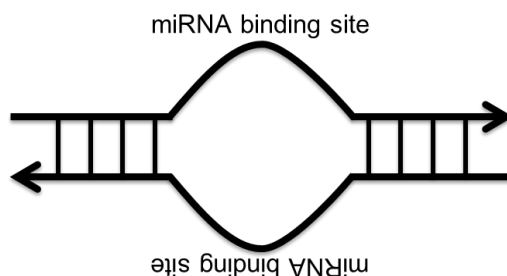
## 第 2 章

# 非修飾 DNA を用いた 新しい miRNA inhibitor

## 2-1. 緒言

マイクロアレイや次世代シーケンサーなどの普及により、あらゆる組織に対する microRNA プロファイリングが世界中で活発に行われている<sup>(1, 2)</sup>。その成果の 1 つとして、がん細胞と正常細胞では miRNA の発現パターンが大きく異なることが次第に明らかにされてきた<sup>(3)</sup>。がん細胞内で過剰に発現している miRNA の中には、がんの形成維持に関わるものも多く含まれており、これらの機能を阻害することによる腫瘍増殖抑制効果が相次いで報告されている<sup>(4, 5)</sup>。ほとんどの場合 miRNA の機能阻害には、miRNA inhibitor と呼ばれる標的 miRNA に対して相補的な配列を持つアンチセンス核酸が用いられる。これら miRNA inhibitor の多くは LNA や 2'OMe などの合成化学修飾核酸である<sup>(6-8)</sup>。これら修飾核酸を用いることにより、アンチセンス核酸の RNA への結合力が飛躍的に高まるため効果的な miRNA の機能阻害が可能になる。化学修飾 miRNA inhibitor は大変有効なツールであるが、合成コストの負担が大きい。一方、非修飾の DNA を用いたアンチセンス核酸は低コストでの合成が可能である。しかしながら非修飾アンチセンス DNA の RNA への結合力は、RNA-RNA 間の結合を阻害できるほど強くなく、これまで miRNA inhibitor として使用することは不可能であった<sup>(9)</sup>。非修飾アンチセンス DNA を用いた miRNA inhibitor の実現には、何らかの手段で miRNA の結合力を高めることが必須である。

抗体の可変領域だけをつなぎ合わせて作られる scFV や diabody の結合力は、ほとんどの場合に由来する抗体の結合力よりも大きく低下してしまう事が知られている<sup>(10)</sup>。つまり抗体の結合力は抗体の可変領域だけに依存するのではなく、抗体全体で安定した構造をとることにより得られていると推測される。この考えを基にして新しい非修飾アンチセンス DNA の開発に取り組んだ。一般的にアンチセンス DNA は標的の核酸分子に対して相補的な配列をもつ 1 本鎖 DNA を指すが、新たに考案したアンチセンス DNA は標的結合配列の末端に 2 本鎖 DNA 領域をもつ。この構造体を「miRNA にふたをする DNA」という意味から LidNA と名付けた (Fig 2-1)。本章ではレポータージーンアッセイを用いて、LidNA の miRNA 阻害効果を検証した。



**Fig 2-1. 標準型 LidNA の構造**

標準型となる LidNA は 2 つの 1 本鎖 DNA を用いて調製した。中心には 2 つの miRNA 結合領域、両末端には 2 本鎖領域を有している。矢印の向きは核酸が 5'-3'の向きに並んでいることを表している。

## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. 細胞培養

ヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞を、ウシ胎児血清(FBS) (CCB)、100 units/mL penicillin G (Wako)および 100 µg/mL streptomycin (Wako)添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wako)を用いて培養した。

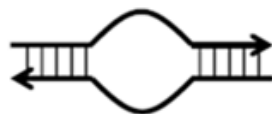
### 2-2-1. LidNA の形成

実験に用いた DNA の合成は全て Greiner 社に依頼した。LidNA を形成するための DNA 鎖を、それぞれ 1.25 – 5.00 µM の濃度になるように PBS (-)中で混合し、95°Cで 5 分間加熱後、30 分以上かけて徐々に 37°Cまで冷却することでアニーリングを行った。LidNA の形成確認は 20%非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により行った。本章において作成した LidNA の配列及び構造を Fig 2-2A、B に示した。

### 2-2-2. レポータージーンアッセイ

LidNA の活性はレポータージーンアッセイを用いて測定した。活性測定には赤色蛍光タンパク質である DsRed2 の発現ベクター(pDsRed2-miR16target)を用いている。DsRed2 遺伝子の 3'-UTR には予め miR-16 の相補配列が組み込まれている (Fig 2-3)。また細胞間のプラスミド導入効率を補正するため、遺伝子内に miR-16 の結合配列を含まない GFP の発現ベクター(pCAGGS-GFP)を用いた。HEK293T 細胞を  $6.0 \times 10^4$  cells/well の割合で 24 穴プレートに播種した。16 - 24 時間後、活性を測定する LidNA、pDsRed2-miR16target、pCAGGS-GFP を、Lipofectamine LTX (Invitrogen)を用いて HEK293T 細胞に同時に導入した。四日目に、培養上清を除き TBST buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05 % Triton-X)を用いて細胞の溶解を行った。1.5 ml 容の遠心チューブに細胞溶解液を移し、遠心分離により不溶性画分を沈殿させた後に、上澄みに含まれる蛍光量を蛍光マイクロプレートリーダー(Thermo Scientific)を用いて測定した。得られた DsRed2/GFP の値を基に LidNA の活性比較を行った。結果は同様の実験を 3 回実施した平均値で示した。

**A**



**LidNA-16(12) (LidNA-16)**

```

5' -GTAAAACGACGGCCAGTCCGCCAATATTTAAATCCGTGCTGCTACGCCCTATAGTGAGTCGTA-3'
      |||||
3' -CATTTTGCTGCCGGTCACATCGTCGTGCAGCTATTTATAACGCCCGGGATATCACTCAGCAT-5'

```

**LidNA-16(4)**

```

5' -GTAAAACGACGGCCAGTCCGCCCGGGAATATTTACGTGCTGCTACGCCCTATAGTGAGTCGTA-3'
      |||||
3' -CATTTTGCTGCCGGTCACATCGTCGTGCATTTATAAAGCTCCGCCCGGGATATCACTCAGCAT-5'

```

**LidNA-16(18)**

```

5' -GTAAAACGACGGCCAGTCCGCCAATATTTACGTGCTGCAGGCTACGCCCTATAGTGAGTCGTA-3'
      |||||
3' -CATTTTGCTGCCGGTCACATCGGAGCTCGTCGATTTATAACGCCCGGGATATCACTCAGCAT-5'

```

**LidNA-143**

```

5' -GTAAAACGACGGCCAGTTGAGCTACAGTGCAAGCTTCATCTCATGCCCTATAGTGAGTCGTA-3'
      |||||
3' -CATTTTGCTGCCGGTCATACTCTACTTAGCTCGTGACATCGAGTCGGGATATCACTCAGCAT-5'

```

**ssLidNA-16**



```

5' -GTAAAACGACGGCCAGTCCGCCAATATTTAAATCCGTGCTGCTACGCCCTATAGTGAGTCGTA-3'

```

**miR-16**

```

5' -CCAGUAUUAACUGUGCUGCUGA-3'
      |||*||| || |||||*
3' -GCGGUUAUAAAUG-CACGACGAU-5'

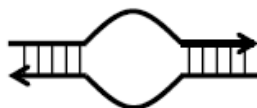
```

**Fig 2-2.** 使用した核酸の構造及び配列

(A) Fig 2-3 に示した LidNA と miRNA の配列および構造を表した。(B) Fig 2-5 に示した LidNA と miRNA の配列及び構造を表した。下線は標的 miRNA に対するミスマッチ塩基を示している。LidNA の概略図において、矢印の向きは核酸塩基が 5' → 3' 方向に並んでいることを示し、miRNA 結合領域の数字は標的とする miRNA の種類を示している。

## B

### Variant 1 (LidNA-16)



5' -GTAAAACGACGGCCAGTCCGCCAATATTTAAATCCGTGCTGCTACGCCCTATAGTGAGTCGTA-3'  
 |||||  
 3' -CATTTTGCTGCCGGTCACATCGTCGTGCAGCTATTTATAACGCCCGGGATATCACTCAGCAT-5'

### Variant 2



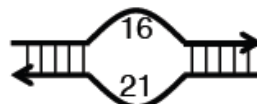
5' -GTAAAACGACGGCCAGTCCGCCAATATTTAAATCCGTGCTGCTACGCCCTATAGTGAGTCGTA-3'  
 5' -CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'  
 |||||  
 3' -CATTTTGCTGCCGGTCACATCGTCGTGCAGCTATTTATAACGCCCGGGATATCACTCAGCAT-5'

### Variant 3



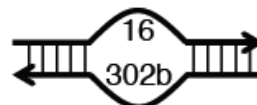
5' -GTAAAACGACGGCCAGTCCGCCAATATTTAAATCCGTGCTGCTACGCCCTATAGTGAGTCGTA-3'  
 |||||  
 3' -CGGGATATCACTCAGCATAATG-5'  
 |||||  
 3' -CATTTTGCTGCCGGTCACATCGTCGTGCAGCTATTTATAACGCCCGGGATATCACTCAGCAT-5'

### Variant 4



5' -GTAAAACGACGGCCAGTCCGCCAATATTTAAATCCGTGCTGCTACGCCCTATAGTGAGTCGTA-3'  
 |||||  
 3' -CATTTTGCTGCCGGTCATATCGAATAGTAGATCTGACTACAACCTCGGGATATCACTCAGCAT-5'

### Variant 5



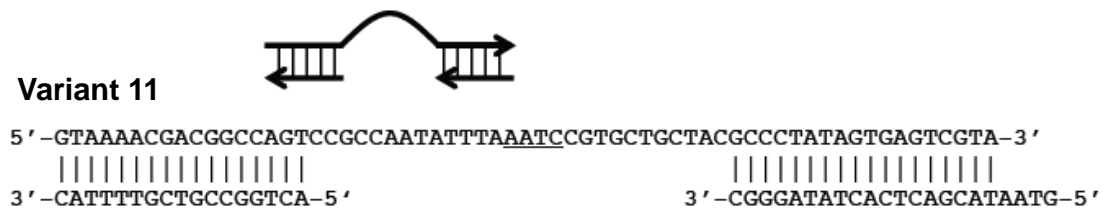
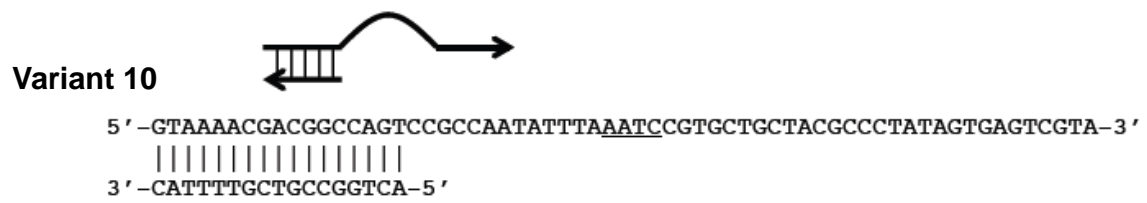
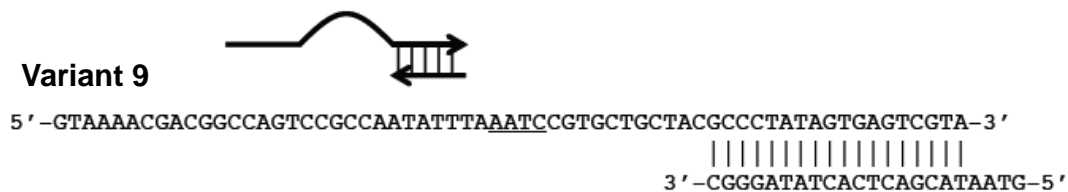
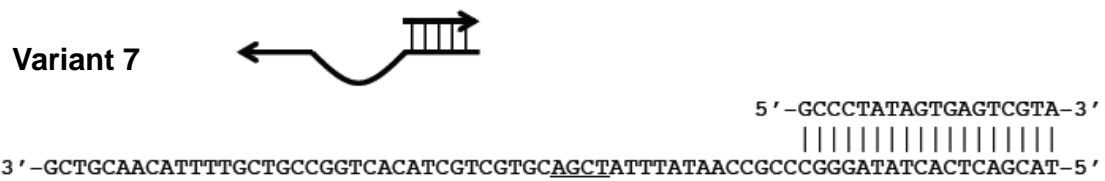
5' -GTAAAACGACGGCCAGTCCGCCAATATTTAAATCCGTGCTGCTA-CGCCCTATAGTGAGTCGTA-3'  
 |||||  
 3' -CATTTTGCTGCCGGTCATATTCACGAAGAGCTGTACAAAATCATCTCGGGATATCACTCAGCAT-5'

### Variant 6



5' -CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'  
 |||||  
 3' -CATTTTGCTGCCGGTCACATCGTCGTGCAGCTATTTATAACGCCCGGGATATCACTCAGCAT-5'

( Fig 2-1 続き)



( Fig 2-1 続き)



**Variant 13** 

5' -CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'  
 |||||  
 3' -GCTGCAACATTTTGCTGCGGTACATCGTCGTCAGCTATTTATAACCGC-5'

**Variant 14** 

5' -CGCCAATATTTAAATCCGTGCTGCTACCGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'  
 |||||  
 3' -GCTGCAACATTTTGCTGCGGTACATCGTCGTCAGCTATTTATAACCGC-5'

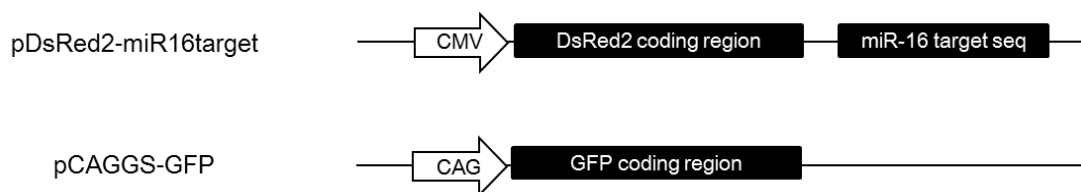
**Variant 15** 

5' -GTAAAACGACGGCCAGTCCGCCAATATTTAAATCCGTGCTGCTA-3'  
 |||||  
 3' -ATCGTCGTCAGCTATTTATAACCGCCCATTTTGCTGCGGTCA-5'

**Variant 16** 

5' -GTAAAACGACGGCCAGTCCGCCAATATTTAAATCCGTGCTGCTA-3'  
 |||||  
 3' -CATTTTGCTGCGGTCA-5'

( Fig 2-1 続き)



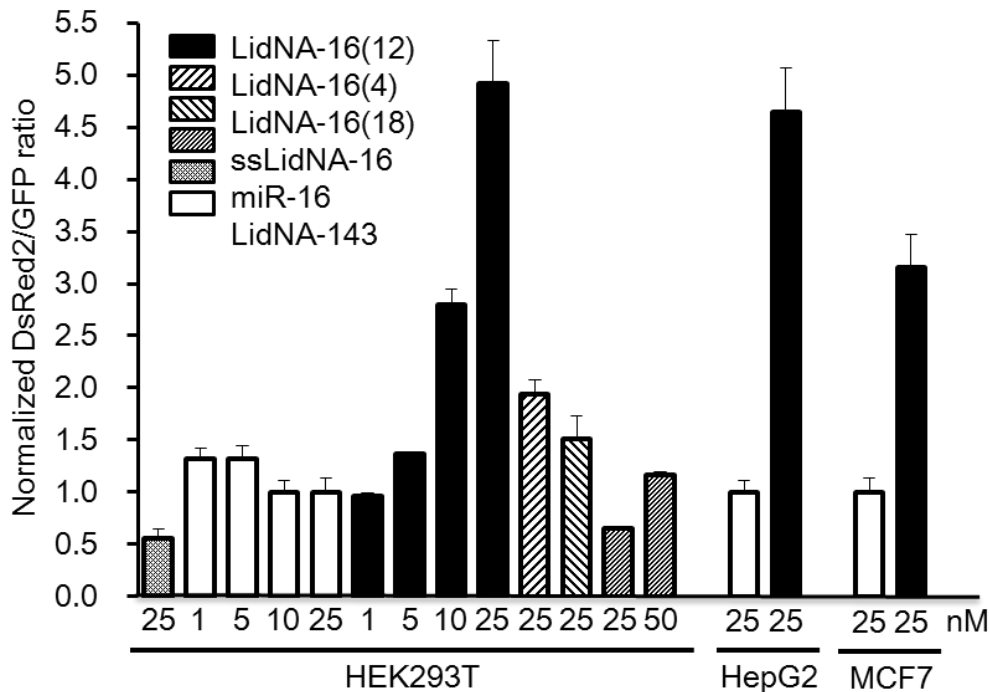
**Fig 2-3.** レポーター遺伝子の構成

DsRed2 遺伝子の 3'-UTR に miR-16 の相補配列が含まれている。DsRed2 mRNA は CMV プロモーターから、GFP mRNA は CAG プロモーターから転写される。

## 2-3. 結果と考察

### 2-3-1. 非修飾 DNA を用いた miRNA inhibitor の設計

本章では HEK293T 細胞で内在的に発現している miR-16<sup>(11)</sup> を標的として LidNA を作製したので、以後 LidNA-16 と表記する。以前の報告において、miRNA inhibitor と miRNA の結合時にミスマッチ配列が存在する場合、高い阻害効果を得られることが報告されているので<sup>(12, 13)</sup>、miR-16 binding site の異なる位置にミスマッチ配列を導入した 3 種類の LidNA-16 を作製し活性を測定した。それぞれの LidNA をミスマッチ配列の導入位置に応じて LidNA-16 (4)、LidNA-16 (12)、LidNA-16 (18) と名付けた。活性測定は、pDsRed2-miR16target および pCAGGS-GFP を用いたレポータージーンアッセイにより行った。pDsRed2-miR16target がもつ DsRed2 遺伝子の 3'-UTR には miR-16 の相補配列が含まれているので、内在性の miR-16 を有する HEK293T 細胞に導入した場合 DsRed2 タンパク質の発現は極めて低い。しかし、このベクターと同時に LidNA-16 を加えると、miR-16 に対する阻害効果の強さに応じて DsRed2 タンパク質が強く発現される。最終的に DsRed2 の蛍光値に対して GFP の蛍光値で補正を行い、DsRed2/GFP の値から LidNA の活性を測定した。ネガティブコントロールとして、HEK293T 細胞で発現がみられない miR-143 を標的とする LidNA-143 を使用した。LidNA-143 は miR-16 に対する相補性をもたないため、miR-16 による DsRed2 タンパク質の発現抑制に影響を与えない。また miR-143 は HEK293T 細胞においてあまり発現が見られないため<sup>(10)</sup>、LidNA-143 が細胞機能に影響を及ぼすことはないと考えられる。

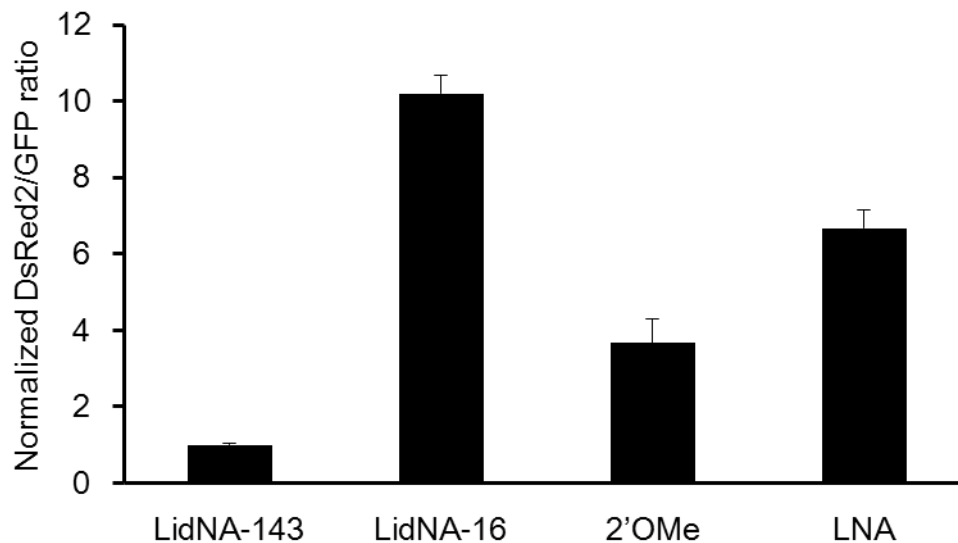


**Fig 2-4. LidNA の活性測定**

レポータージーンアッセイにより様々な細胞種における LidNA の活性および、ミスマッチ領域の位置と LidNA の活性との関係を調べた。各細胞種において 25 nM の LidNA-143 導入時に得られた値を基準とした。

HEK293T 細胞を用いたレポータージーンアッセイの結果、LidNA-16(4)、LidNA(12)、LidNA(18)は 25 nM の濃度において miR-16 に対する阻害効果をもつことが明らかになった。LidNA(12)は特に高い活性を示し 10 nM の濃度においても miR-16 の機能を阻害した(Fig 2-4)。異なる濃度で LidNA-143 を導入した場合にも DsRed2 の発現量に変化が起こらなかったことから、LidNA-16 を用いた際に起こる DsRed2 の発現は miR-16 に対する機能阻害によるものであると考えられる。また HepG2、MCF7 においても同様にレポータージーンアッセイを行い LidNA-16 (12)の活性を調べたところ、細胞種の違いに依らず miR-16 の機能を効果的に阻害することを確認した。

また HEK293T 細胞を用いたレポータージーンアッセイにより、2'OMe および LNA を用いて合成した miR-16 に対する化学修飾 miRNA inhibitor の活性を測定し、LidNA-16 (12)の活性との比較を行った。Fig 2-5 に示すように、LidNA-143 導入時と比較して DsRed2 の蛍光値が、2'OMe miRNA inhibitor 導入時には約 4 倍、LNA miRNA inhibitor 導入時には約 7 倍上昇した。一方、LidNA-16(12)を加えた場合には DsRed2 の蛍光値が約 10 倍上昇した。このことから、LidNA-16(12)は miR-16 に対して、既知の化学修飾 miRNA inhibitor よりも高い阻害効果を有することが示された。以降の実験においては LidNA-16 (12)を標準型とし、これを LidNA-16 と表記する。



**Fig 2-5.** LidNA-16 と化学修飾 miRNA inhibitor との活性比較実験

レポータージーンアッセイにより LidNA-16 と既存の miRNA inhibitor の活性を比較した。

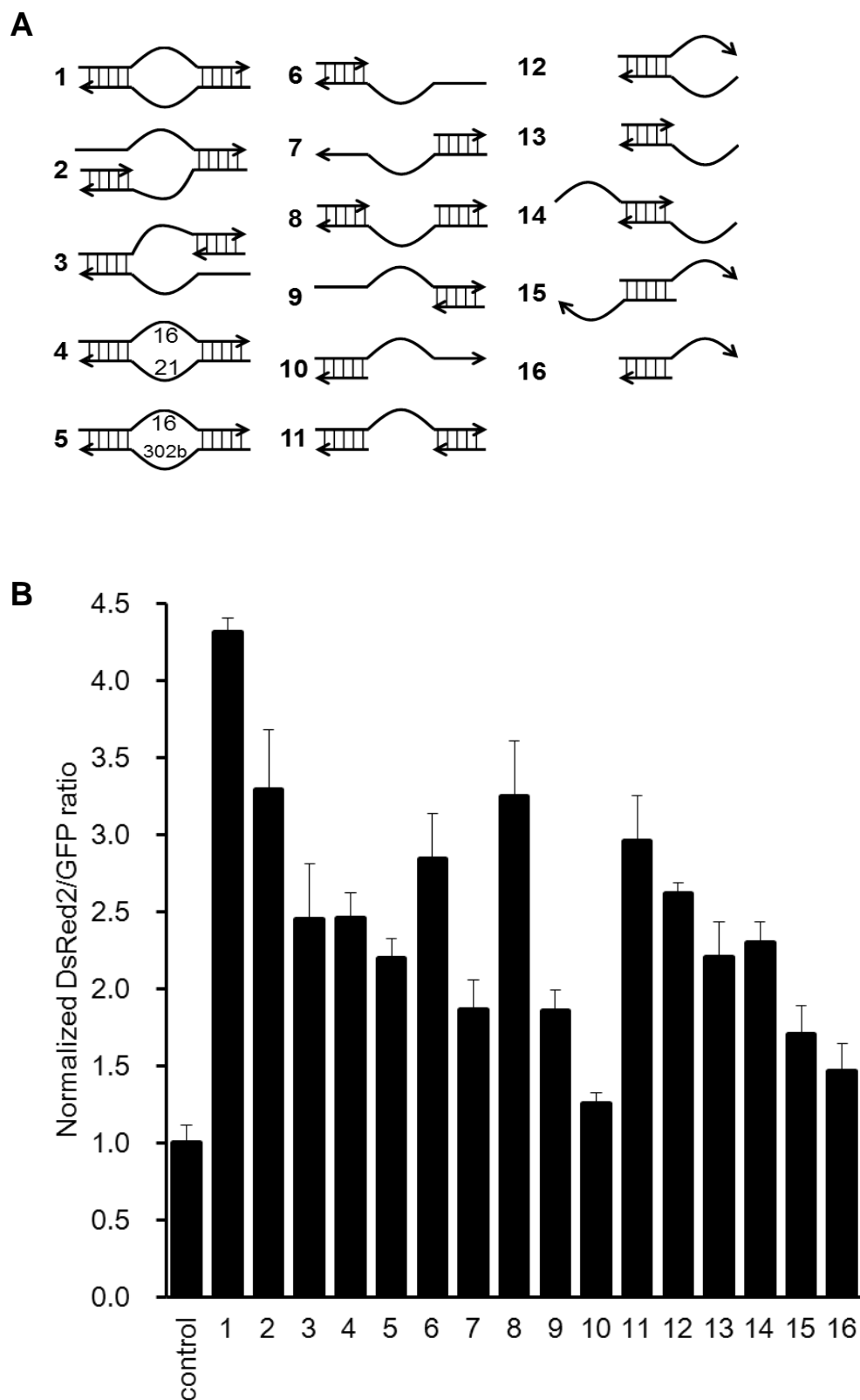
### 2-3-2. LidNA の構造と活性との関係

これまでの実験で LidNA が miRNA 阻害効果をもつことが明らかになった。次に LidNA-16 の構造を少しずつ変化させ、miRNA 阻害効果にどの程度影響するのかを検証した。設計した LidNA 変異体の模式図を Fig 2-6A に示す。詳細な配列および構造に関しては Fig 2-2B にまとめた。これら変異体の活性をレポータージーンアッセイにより比較した。**1** は標準型の LidNA-16 であり、**2**、**3** は **1** の 2 本鎖領域の片側にアンチセンス鎖を加え不安定化させたものである。**2**、**3** が共に **1** よりも低い活性を示したことは、2 本鎖領域の不安定化が LidNA の活性低下につながることを表している。**4**、**5** は **1** が 2 つ有する miR-16 binding site の片側を miR-21 binding site もしくは miR-302 binding site に置換したものである。これらも **1** より低い活性を示したが、miRNA 阻害活性を完全に失うことはなかった。つまり LidNA が活性をもつためには、必ずしも 2 つの miRNA binding site を必要とするわけではないと言える。

**6**~**11** の変異体は全て miRNA binding site を 1 つだけ有しており、2 本鎖領域の位置および配列がそれぞれ異なっている。**6** および **9** は miRNA binding site の 3'側に配列の異なる 2 本鎖領域を有する。**7** および **10** は miRNA binding site の 5'側に配列の異なる 2 本鎖領域を有する。**8** および **11** は miRNA binding site の両端に配列の異なる 2 本鎖領域を有している。**6**、**7**、**8** 間および **9**、**10**、**11** 間での活性を比較すると、両端に 2 本鎖領域をもつ **8** および **11** が最も高い活性を持つことが分かる。また miRNA binding site の 3'側に 2 本鎖領域を持つ **6** および **9** は、miRNA binding site の 5'側に 2 本鎖領域を持つ **7**、**10** よりもそれぞれ高い活性を示した。**6**~**8** および **9**~**11** の結果から、LidNA は miRNA binding site が 2 つ存在しない場合

にも miRNA 阻害活性を有することを確認した。miRNA binding site の片側にしか 2 本鎖領域が存在しない場合にも LidNA は miRNA に対する阻害活性を示したが、両側に 2 本鎖領域を持つ場合に大きく活性が高まった。また 2 本鎖領域の位置および配列が LidNA の活性に影響することが分かった。

上記の変異体に加えて、**12**～**16** のように 1 つの 2 本鎖構造に、様々な組み合わせで miRNA binding site を付加した LidNA 変異体を作製した。**12**、**13**、**16** の活性を比較すると、やはり 2 つの miRNA binding site をもつ **12** が、1 つの miRNA binding site をもつ **13** および **16** よりも高い活性を示した。また **14** と **15** の活性を比較すると、それぞれの miRNA binding site の 3'側に 2 本鎖領域をもつ **14** が、5'側に 2 本鎖領域を有する **15** よりも高い活性を有することが分かった。**6** と **7**、**9** と **10** の活性の比較からも miRNA binding site の 3'側に 2 本鎖領域を付加した場合に、5'側に 2 本鎖領域を付加した場合よりも効率よく LidNA の活性を高められることが示された。これらの結果から、LidNA の miRNA 阻害活性に miRNA binding site の両端に存在する 2 本鎖領域が大きく影響していることが示唆される。本章において開発した LidNA は非修飾 DNA から成る世界で初めての miRNA inhibitor である。LidNA は既存の化学修飾 miRNA inhibitor を上回る活性をもつ上、安価で合成することが可能である。今後、LidNA の基礎研究ツールや医薬への応用が期待される。



**Fig 2-6. LidNA の構造と miRNA 阻害活性の関係**

(A) 作製した LidNA 変異体の構造を示した。(B) レポーター遺伝子アッセイにより、各 LidNA 変異体の活性を測定した。ネガティブコントロールとして LidNA-143 を使用した。

## 2-4. 参考文献

1. **Castoldi, M., Schmidt, S., Benes, V., Noerholm, M., Kulozik, A. E., Hentze, M. W., and Muckenthaler, M. U.:** A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA*, **12**, 913-920 (2006).
2. **Wu, Q., Lu, Z., Li, H., Lu, J., Guo, L., and Ge, Q.:** Next-generation sequencing of microRNAs for breast cancer detection. *J Biomed Biotechnol*, **2011**, 597145 (2011).
3. **Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., and 8 authors:** A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2257-2261 (2006).
4. **Corsten, M. F., Miranda, R., Kasmieh, R., Krichevsky, A. M., Weissleder, R., and Shah, K.:** MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth *in vivo* and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Res*, **67**, 8994-9000 (2007).
5. **Fontana, L., Fiori, M. E., Albini, S., Cifaldi, L., Giovinnazzi, S., Forloni, M., Boldrini, R., Donfrancesco, A., Federici, V., Giacomini, P., Peschle, C., and Fruci, D.:** Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS One*, **3**, e2236 (2008).
6. **Hutvagner, G., Simard, M. J., Mello, C. C., and Zamore, P. D.:** Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol*, **2**, e98 (2004).
7. **Elmen, J., Lindow, M., Schutz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjarn, M., Hansen, H. F., Berger, U., and other 5 authors:** LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*, **452**, 896-899 (2008).
8. **Lennox, K. A. and Behlke, M. A.:** Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides. *Gene Ther*, **18**, 1111-1120 (2011).
9. **Meister, G., Landthaler, M., Dorsett, Y., and Tuschl, T.:** Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA*, **10**, 544-550 (2004).
10. **Tian, W., Dong, X., Liu, X., Wang, G., Dong, Z., Shen, W., Zheng, G., Lu, J., Chen, J., Wang, Y., and other 2 authors:** High-throughput functional microRNAs profiling by recombinant AAV-based microRNA sensor arrays. *PLoS One*, **7**, e29551 (2012).
11. **Kipriyanov, S. M., Moldenhauer, G., Martin, A. C., Kupriyanova, O. A., and Little, M.:** Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity. *Protein Eng*, **10**, 445-453 (1997).

12. **Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C., and Erdmann, V. A.:** Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, **30**, 1911-1918 (2002).
13. **Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., and Bartel, D. P.:** MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, **27**, 91-105 (2007).



# 第 3 章

## LidNA の miRNA 阻害機構の解明

### 3-1. 緒言

前章において、非修飾 DNA から成る miRNA inhibitor である LidNA の miRNA binding site の両端に存在する 2 本鎖領域が、LidNA の miRNA 阻害活性に寄与することが示された。本章では互いに相補的な 2 本のオリゴヌクレオチド間の結合・離速度定数への 2 本鎖 DNA の付加が与える影響を調べると共に、LidNA の miRNA 阻害機構の解明を試みた。

2 本鎖領域の付加が miRNA 阻害活性に寄与する機構として 2 つの可能性を考えた。1 つは、miRNA の末端塩基と隣接する 2 本鎖領域の末端塩基間に生じるスタッキング効果である<sup>(1, 2)</sup>。Riccelli ら<sup>(3)</sup>、Yuan ら<sup>(4)</sup>は DNA アンチセンス鎖にステムループ構造を付加することにより、標的デオキシオリゴヌクレオチドに対する親和性が上昇したことを報告した。さらに Yuan らは、ステムループ構造の付加がアンチセンス鎖の結合および解離速度定数に影響すると述べている。彼らはステムループ構造の付加によって得られる効果を、塩基間のスタッキング効果であると結論づけている。もう 1 つの可能性は、2 本鎖領域の付加による miRNA 結合領域の構造の安定化である。LidNA の 2 本鎖領域が miRNA 結合領域の分子運動を制限し、miRNA との安定な結合を促進しているのではないかと考えた。これら 2 つの仮説を検証するために LidNA と miRNA の相互作用解析および、miRNA 結合領域の安定性解析を行った。相互作用解析には表面プラズモン共鳴解析を<sup>(5)</sup>、安定性解析には蛍光偏光解析<sup>(6)</sup>を用いた。

### 3-2. 材料と方法

#### 3-2-1. オリゴヌクレオチド間の相互作用解析

LidNA と miRNA の相互作用解析は Biacore3000 システムを用いて行った。システム内の温度は 25°C に設定した。ランニング緩衝液および試薬の希釈用溶液には HBS-EP buffer (GE Healthcare)を用いた。センサーチップ表面への各種核酸の固定化には、アビジン-ビオチン結合<sup>(7)</sup>を利用した。Amine coupling Kit により、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)と *N*-hydroxy succinimide (NHS)を用いたアミンカップリングを行い、Streptavidin (200 µg/mL)をセンサーチップ CM5 表面に固定化した。続けて、ビオチン化標識した 5 µM の anchor oligonucleotide を注入しセンサーチップに固定化した。その後、各種プローブ形成用のオリゴ DNA を注入し anchor oligonucleotide と飽和状態になるまで結合させた (Fig3-1)。形成したプローブに対し、miR-16 と同様の配列を持つ DNA (16DNA)を段階的な濃度で注入し結合解離曲線を得た。解析は BIA evaluation software を用いて行った。

### 3-2-2. 蛍光偏光解析

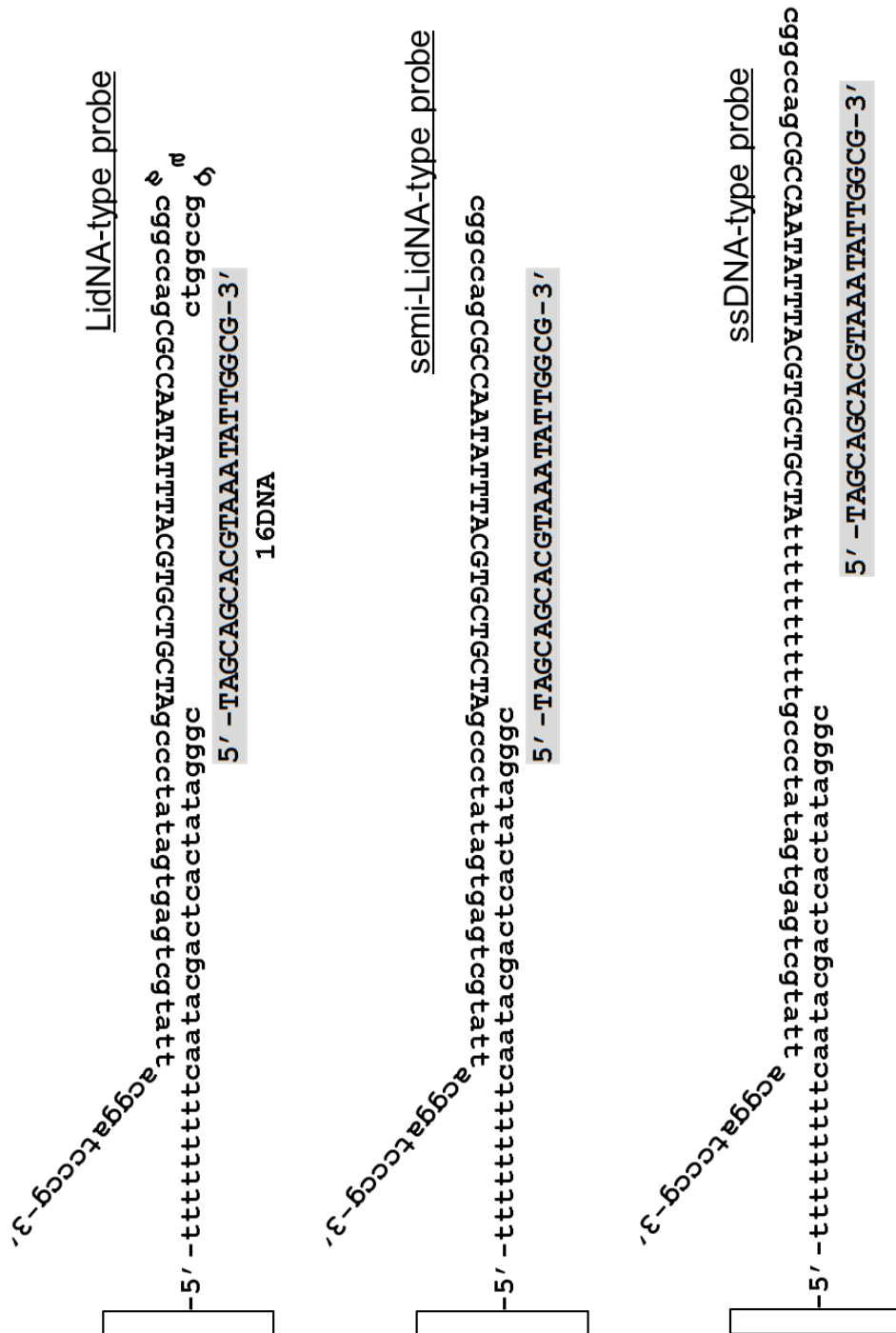
蛍光偏光測定に用いる FITC 標識 DNA プローブを日本バイオサービスから、2 本鎖形成用 DNA(Ds1-Ds10)を Greiner から購入した。25 pmol の FITC 標識 DNA プローブと 25 pmol の各相補鎖 DNA を 10  $\mu$ l の annealing buffer (100 mM potassium acetate、30 mM HEPES-KOH (pH 7.4)、2 mM magnesium acetate)中で混合し、95°C で 5 分間加熱後、37°C まで穏やかに冷却することで 2 本鎖を形成させた。それぞれの 2 本鎖 DNA を 6  $\times$  50 mm culture tube (Kimble) 内で 10 nM になるように annealing buffer で希釈した。蛍光偏光値の測定には Beacon2000 (Pen Vara)を使用した。励起光フィルターは 490 nm、吸収光フィルター 530 nm のものを使用した。結果は同様の実験を 3 回実施した平均値で示した。

## 3-3. 結果と考察

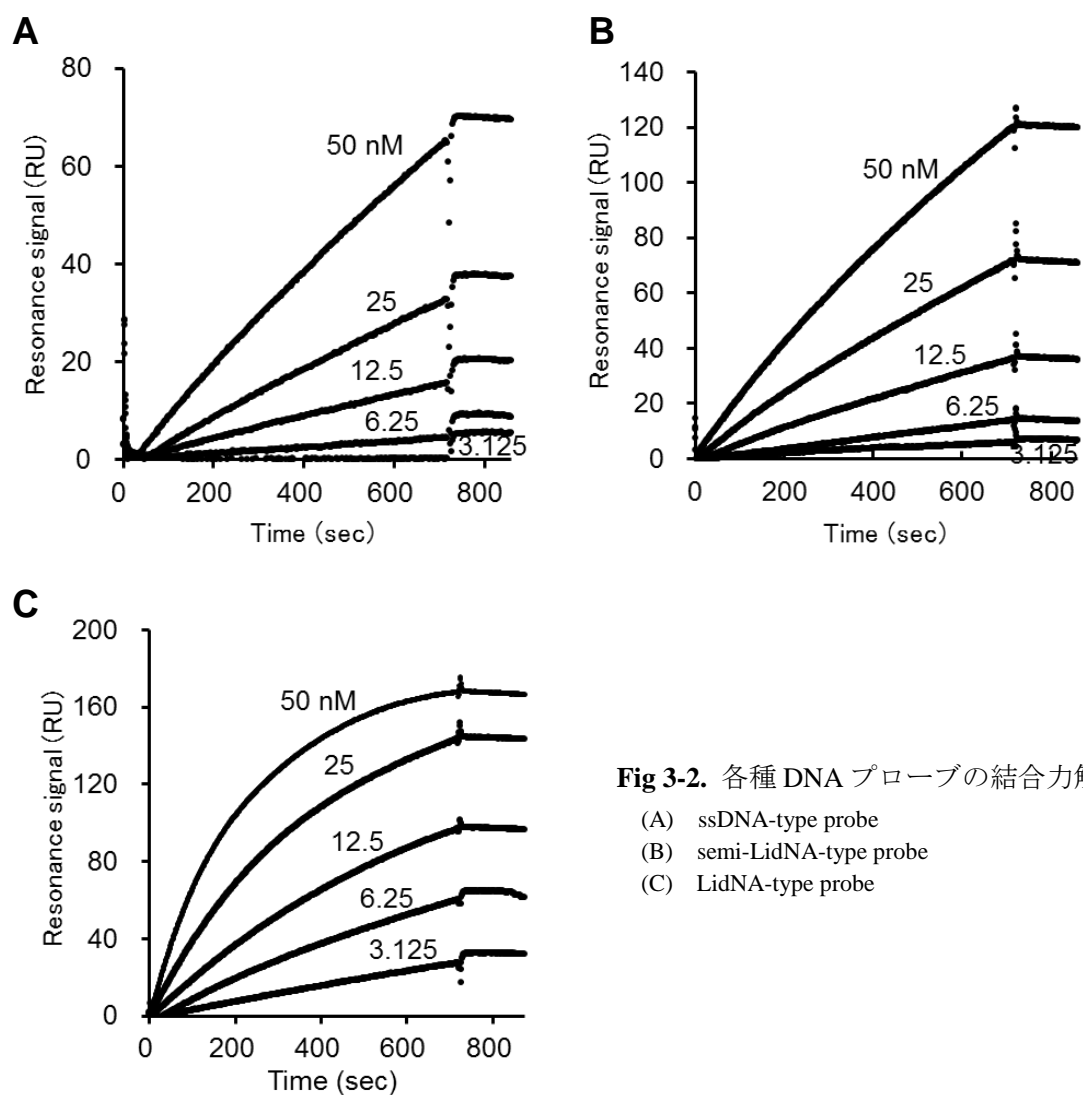
### 3-3-1. オリゴヌクレオチド間結合に対する 2 本鎖領域の影響

LidNA の miRNA への結合力が 2 本鎖領域の付加により高められることを確認するために、Fig 3-1 に示す 3 種類の核酸プローブを設計した。LidNA-type probe は、miR-16 binding site の両端に 2 本鎖領域をもつ。semi-LidNA-type probe は、miRNA binding site の 5'末端には 2 本鎖領域をもつが、3'側には 1 本鎖領域をもつ。ssDNA-type probe は、miRNA binding site の両端が 1 本鎖 DNA 領域となっている。これらの核酸プローブはアビジン-ビオチン結合によりセンサーチップ表面に固定化されている。標的核酸として miR-16 と同様の配列を有する 16DNA を使用した。それぞれの核酸プローブと 16DNA との相互作用を表面プラズモン解析により測定した。

Fig 3-2 に解析の結果得られたセンサーグラムを示す。ssDNA-type probe (Fig 3-2A)と semi-LidNA-type probe (Fig 3-2B)の結果を比較すると、片側に 2 本鎖領域を持つ semi-LidNA-type probe の方がより高い結合力をもつことが分かる。さらに semi-LidNA-type probe と LidNA-type probe (Fig 3-2C)の結果を比較することにより、2 本鎖領域を両端にもつ LidNA-type probe はさらに高い結合力をもつことが分かる。Table 3-1 にそれぞれの結合・解離速度定数と解離定数を算出した結果をまとめた。結合速度定数を比較すると ssDNA-type probe に対して semi-LidNA-type probe は約 100 倍、LidNA-type probe は約 500 倍高い値を示した。解離速度定数を比較すると ssDNA-type probe に対して semi-LidNA type probe は約 2 倍、LidNA-type probe は約 5 倍低い値を示した。最後に解離定数の比較から、ssDNA-type probe に対して semi-LidNA type probe は 140 倍、LidNA-type probe は 1800 倍高い結合力を有することが示された。これらの結果から、LidNA の 2 本鎖領域は LidNA と miRNA の会合を強く促すことで LidNA に高い結合力を与えていると推察される。



**Fig 3-1.** 表面プラズモン解析に用いたプローブの配列と構造  
 プローブ中の大文字で表した塩基は網掛けで示した 16DNA と相補鎖を形成する。



**Fig 3-2.** 各種 DNA プローブの結合力解析

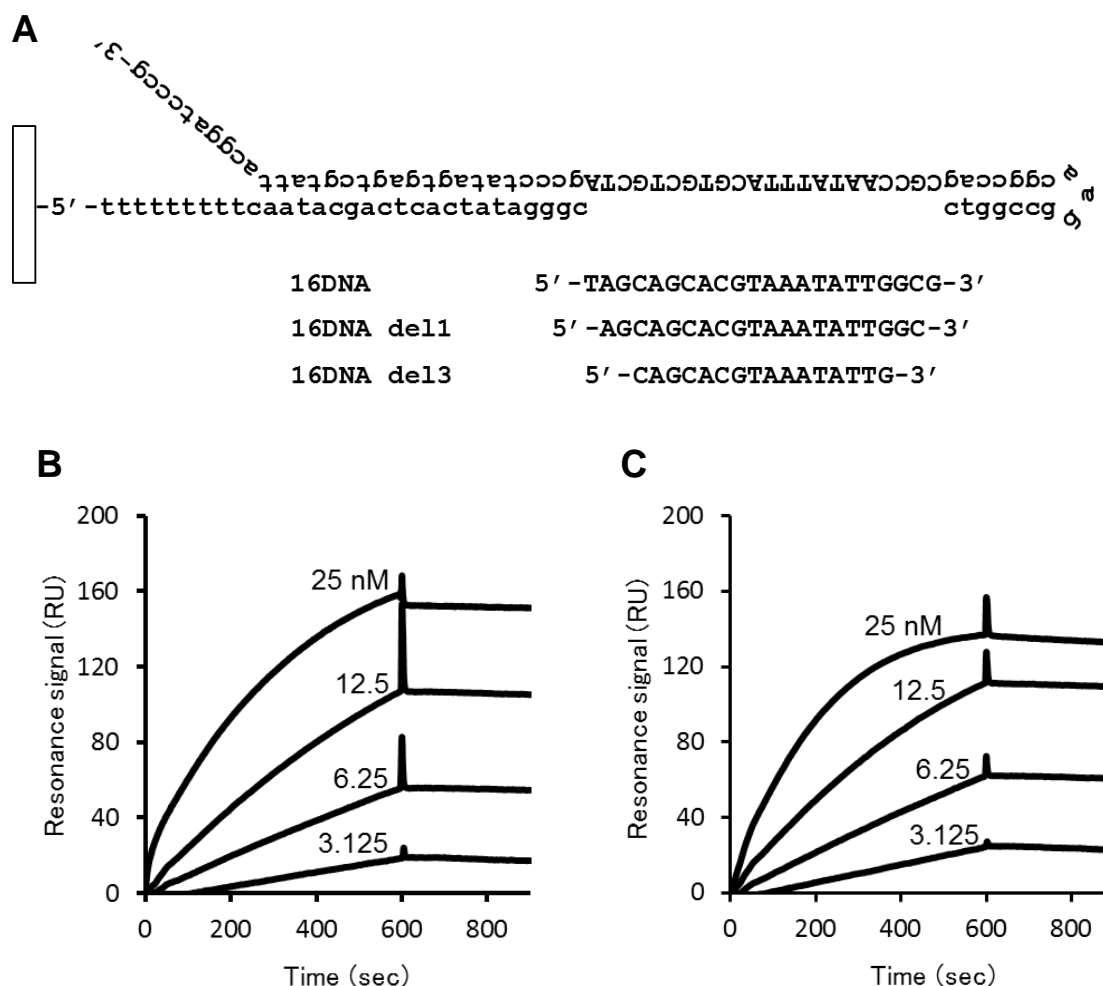
- (A) ssDNA-type probe  
(B) semi-LidNA-type probe  
(C) LidNA-type probe

**Table 3-1.** 表面プラズモン解析により得られた結合・解離速度定数および解離定数

Target DNA	Probe type	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ value
16DNA	LidNA	$9.2 \times 10^4$	$5.0 \times 10^{-5}$	0.54 nM
	semi-LidNA	$1.4 \times 10^4$	$9.6 \times 10^{-5}$	7.1 nM
	ssDNA	$1.9 \times 10^2$	$1.9 \times 10^{-4}$	1.0 $\mu$ M
16DNA del1	LidNA	$8.0 \times 10^4$	$1.3 \times 10^{-5}$	0.16 nM
16DNA del3	LidNA	$1.4 \times 10^5$	$8.7 \times 10^{-5}$	0.64 nM

2 本鎖領域が LidNA の結合力を高めていることが明らかになったので、次にその作用機構の解明に取り組んだ。まず LidNA-type probe と 16DNA の隣接する塩基間で起こるスタッキング効果の影響について検証した。そのために設計した新しい標的 DNA を Fig 3-3A に示す。16DNA del1 は LidNA-type probe に結合する際、2 本鎖領域に対して 1 塩基分の隙間を形成する。16DNA del3 は同様に 3 塩基分の隙間を形成する。つまり、これらの標的 DNA が LidNA-type probe と結合する際に塩基スタッキングは生じない。先ほどの実験と同様に、LidNA-type probe と 16DNA del1 および 16DNA del3 との相互作用を解析することで、塩基スタッキングが LidNA の結合にどれだけ寄与しているかを調べた。

解析の結果得られたセンサーグラムを Fig 3-3B、C に示す。どちらのセンサーグラムにおいても、16DNA に対する解析時に得られたものと大きな変化は見られなかった。また Table 3-1 に示されたように結合速度定数、解離速度定数、解離定数いずれの値においても、16DNA



**Fig 3-3. 塩基スタッキング効果の確認**

(A) 塩基欠損型 16DNA の配列を示した。(B) LidNA-type probe と 16DNA del1 の相互作用解析を行った。(C) LidNA-type probe と 16DNA del3 の相互作用解析を行った。

del1 および 16DNA del3 は 16DNA とほぼ同等の数値を示した。つまり、LidNA と 16DNA が結合する際に起こる塩基スタッキングは、それほど強く LidNA の結合力に寄与していないと考えられる。

### 3-3-2 蛍光偏光解析による miRNA binding site の安定性の評価

次に LidNA の 2 本鎖領域が miRNA-binding site の構造安定性を高めているかを検証するために、FITC 標識 DNA プローブを用いた蛍光偏光解析実験を行った。蛍光偏光値は蛍光標識した塩基周辺の分子運動の大小によって変化し、分子運動が小さいほど蛍光偏光値は大きくなる。Fig 3-4A に示すように 10 種類の短鎖 DNA は、蛍光標識塩基の隣接部位に 2 本鎖を形成する Ds1 から、番号が大きくなると共に 2 本鎖形成部位が 1 塩基ずつ離れていくようにデザインされている。蛍光偏光値を測定した結果を Fig 3-4B に示した。どの位置に 2 本鎖が形成されても、2 本鎖を有さない場合よりも蛍光偏光は高い値を示し、二本鎖が蛍光標識塩基の動きを抑制していることが分かった。そして、蛍光標識塩基（矢印）に隣接する形で 2 本鎖領域を形成する Ds1 を用いた場合に最も高い蛍光偏光値を示した。さらに 2 本鎖形成領域が蛍光標識塩基から遠ざかるにつれて、徐々に蛍光偏光値が低下することが明らかになった。興味深いことに Ds3、Ds5、Ds9 という 5'末端にアデニンまたはチミンをもつ短鎖 DNA により 2 本鎖が形成される場合には、わずかながら蛍光偏光値が上昇した。これは 2 本鎖領域の末端塩基対の結合が弱い方が、隣接する一本鎖領域の運動を効率よく抑制することを表している。

また Table 3-1 において、2 本鎖領域を付加することで LidNA-type probe と 16DNA 間の結合速度が大幅に上昇することが示された。蛍光偏光解析で得られたデータと併せて考えると、LidNA の高い結合力は 2 本鎖領域が miRNA binding site の運動を抑制し、標的となる miRNA との会合が促進されることでもたらされていると推察できる。以上の結果から LidNA の miRNA 阻害活性は、塩基スタッキング効果ではなく miRNA binding site の安定化によってもたらされるものであると言える。2 本鎖領域の付加はアンチセンス核酸全般の結合力を増大させ得る非常に簡単で優れた方法である。今後、2 本鎖構造付加法と化学修飾法を組み合わせることにより、より強力なアンチセンス核酸の創出が可能になると期待される。





### 3-4. 参考文献

1. **Protozanova, E., Yakovchuk, P., and Frank-Kamenetskii, M. D.:** Stacked-unstacked equilibrium at the nick site of DNA. *J Mol Biol*, **342**, 775-785 (2004).
2. **Yakovchuk, P., Protozanova, E., and Frank-Kamenetskii, M. D.:** Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Res*, **34**, 564-574 (2006).
3. **Riccelli, P. V., Merante, F., Leung, K. T., Bortolin, S., Zastawny, R. L., Janeczko, R., and Benight, A. S.:** Hybridization of single-stranded DNA targets to immobilized complementary DNA probes: comparison of hairpin versus linear capture probes. *Nucleic Acids Res*, **29**, 996-1004 (2001).
4. **Yuan, B. F., Zhuang, X. Y., Hao, Y. H., and Tan, Z.:** Kinetics of base stacking-aided DNA hybridization. *Chem Commun (Camb)*, 6600-6602 (2008).
5. **Malmqvist, M.:** BIACORE: an affinity biosensor system for characterization of biomolecular interactions. *Biochem Soc Trans*, **27**, 335-340 (1999).
6. **Dandliker, W. B., Schapiro, H. C., Meduski, J. W., Alonso, R., Feigen, G. A., and Hamrick, J. R., Jr.:** Application of Fluorescence Polarization to the Antigen-Antibody Reaction. Theory and Experimental Method. *Immunochemistry*, **1**, 165-191 (1964).
7. **Wilchek, M. and Bayer, E. A.:** The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Anal Biochem*, **171**, 1-32 (1988).



## 第 4 章

# DNA パッセンジャー鎖の 延長による RNA/DNA ハイブリッド siRNA の高活性化

## 4-1. 緒言

miRNA は細胞内に存在する 21-25 塩基長の 2 本鎖 RNA で RNA 干渉を介し遺伝子発現の調節を行っている。miRNA は標的 mRNA との間にいくつかのミスマッチを有し完全な相補性を有していない。一方、人工的に作成した標的 mRNA と完全相補性を有する 2 本鎖 RNA、siRNA も、細胞内に導入すると標的 mRNA を分解しコードされているタンパク質の発現を阻害する<sup>(1)</sup>。その優れた阻害効率および選択性が評価され、siRNA は生命科学研究における基本ツールの 1 つとして幅広く活用されている。医療分野においても次世代の分子標的薬候補として大変期待されているが<sup>(2)</sup>、生体内での深刻な副作用が問題となり siRNA 医薬品の開発は停滞している<sup>(3)</sup>。siRNA が過剰に存在すると細胞内の RNA 干渉経路が飽和され、内在性 miRNA のバランスが乱れる可能性がある<sup>(4,5)</sup>。また RISC へのパッセンジャー鎖の誤った取り込みによって、オフターゲット効果と呼ばれる非特異的遺伝子発現抑制が起こることも危惧されている<sup>(6)</sup>。さらに siRNA は Toll-like receptor 3 (TLR3)依存性のインターフェロン応答を引き起こすことも知られている<sup>(7, 8)</sup>。これら副作用の問題を解決することは、siRNA 医薬の実現に向けて非常に大きな課題である。

すでに低副作用性の siRNA の開発が活発に行われており、細胞レベルにおいて優れた効果を示す手法が多数報告されている。例えば、パッセンジャー鎖をガイド鎖より短くすることにより、パッセンジャー鎖の RISC への取り込みを抑えオフターゲット効果を軽減することが可能である<sup>(9)</sup>。また、Bulge-siRNA<sup>(10)</sup>、chimeric siRNA<sup>(11)</sup>、2'OMe modified siRNA<sup>(12)</sup>などを用いることもオフターゲット効果の軽減には非常に有効である。加えて、核酸塩基に対する様々な化学修飾が、インターフェロン応答性の免疫反応を回避する有効な方法であると報告されている<sup>(13-15)</sup>。その一方、修飾核酸の合成にコストがかかるという問題がある。

そこで本章では、RNA ガイド鎖と DNA パッセンジャー鎖からなる hetero siRNA (HsiRNA) を用いることで siRNA に付随する問題の解決を図ることにした。HsiRNA は通常の siRNA よりも合成コストが低く、さらにオフターゲット効果や免疫応答を誘導しないことが期待される。しかし、一般に HsiRNA は siRNA としての活性が低いということが知られているため、HsiRNA の末端に様々な配列を加えることにより高活性型 HsiRNA の創製を目指した。また、それらのインターフェロン応答性についても併せて検討を行った。

## 4-2. 材料と方法

### 4-2-1. 細胞培養

ヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞およびヒト子宮頸がん由来 HeLa S3 細胞は、10% ウシ胎児血清(FBS) (CCB)、100 units/mL penicillin G (Wako)および 100 µg/mL streptomycin (Wako)添加

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wako)を用いて培養した。

#### 4-2-2. siRNA と HsiRNA の調製

使用した RNA の化学合成は全て Sigma 社に依頼した。また使用した DNA の合成は全て Greiner 社に依頼した。トランスフェクションを行う直前に、ガイド鎖となる RNA およびパッセンジャー鎖となる RNA もしくは DNA をそれぞれ 1.25 pmol/ $\mu$ l の濃度になるよう annealing buffer (100 mM potassium acetate, 30 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 2 mM magnesium acetate)内で混合し、95°Cで 5 分加熱後、30 分以上かけて 37°Cまで徐々に冷却することで 2 本鎖を形成させた (Fig 4-1)。

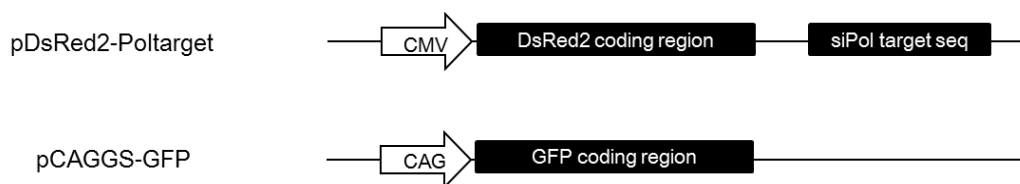
siPol	HsiPol
5' - uuggcagucaccuuccucaacguug - 3'	5' - uuggcagucaccuuccucaacguug - 3'
3' - aaccgucaguggaacgaguugcaac - 5'	3' - AACCGTCAGTGGGAAGGAGTTGCAAC - 5'

**Fig 4-1.** siPol および HsiPol の構造と配列

RNA を小文字、DNA を大文字で示した。上側の鎖がガイド鎖、下側の鎖がパッセンジャー鎖である。

#### 4-2-3. レポータージーンアッセイ

赤色蛍光タンパク質 DsRed2 の発現ベクターである pDsRed2-C1 に含まれる DsRed2 遺伝子の 3'-UTR に siPol の標的となる配列を組み込んだ(Fig 4-2)。得られたプラスミドは pDsRed2-poltarget と表記する。核酸の細胞へのトランスフェクションは Multifectam (Promega)を用いて製造会社のプロトコール通りに行った。HEK293T 細胞を  $1 \times 10^4$  cells/well の濃度で 96 穴プレートに播種し一晩培養した。16 - 24 時間後、5 ng の pDsRed2-poltarget、5 ng の pCAGGS-GFP、2.5 - 5 nM の siRNA または HsiRNA を同時に細胞内へ導入した。ネガティブコントロール用の siRNA としてヒトの遺伝子発現を妨げない control siRNA (5'-GCGCGUUUGUAGGAUUCG-3') を使用した。トランスフェクション実施から 48 時間後に培養上清を除き、RIPA buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% NP-40)を用いて細胞を溶解した。Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific)を用いて細胞溶解液中の DsRed2 および GFP の蛍光量を測定し、得られた値から DsRed2/GFP の値を求めた。control siRNA で処理した細胞から得られた DsRed2/GFP を標準値として、それぞれの補正值を求めた。GFP を標的とした実験では GFP/DsRed2 の値を使用した。結果は同様の実験を 3 回実施した平均値で示した。統計処理は Student t 検定により行った。



**Fig 4-2.** レポーター遺伝子の構成

DsRed2 遺伝子の 3'-UTR に siPol の標的配列が含まれている。DsRed2 mRNA は CMV プロモーターから、GFP mRNA は CAG プロモーターから転写される。

#### 4-2-4. qRT-PCR による IFN $\beta$ 、IP-10、OAS1 mRNA の定量

細胞内への核酸の導入は X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche)を用いて製造会社のプロトコール通りに行った。HeLa S3 細胞を  $6 \times 10^4$  cells/well の濃度で 24 穴プレートに播種し、一晚培養した。16–24 時間後、30 nM の siRNA、30 nM の HsiRNA、100 ng の poly (I:C)のいずれかをトランスフェクションにより導入した。9 時間後に培養上清を除き、Trizol (Invitrogen)を用いて全 RNA を抽出した後、イソプロパノール沈殿法により全 RNA を単離・精製した。得られた全 RNA から PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara)を用いて cDNA を合成した。mRNA の定量は qRT-PCR 法を用いて行った。試薬は SYBR Premix Ex Taq (Takara)を使用し、装置は Mx3000p Real-time QPCR System (Stratagene)を使用した。各遺伝子の検出に用いたプライマーの配列を以下に示す。(Interferon beta (IFN $\beta$ ) mRNA 検出用プライマー、 IFN $\beta$ -F: 5'-TCACTGTGCCTGGACCATAG-3'; IFN $\beta$ -R: CAGCATCTGCTGGTTGAAGA; Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) mRNA 検出用プライマー, IP-10-F: 5'-GCTCTACTGAGGTGCTATGTTC-3'; IP-10-R: 5'-CCCTTGGAAGATGGGAAAGGT; 2'-5'-oligoadenylate synthetase 1 (OAS1) mRNA 検出用プライマー, OAS1-F: 5'-GCAGAAGAGGACTGGACCTG-3'; OAS1-R: 5'-TAGAAGGCCAGGAGTCAGGAPCR-3'; GAPDH mRNA 検出用プライマー, GAPDH-F: 5'-TCCCATCACCATCTTCCA-3'; GAPDH-R: 5'-CATCACGCCACAGTTTCC-3') 各 mRNA 発現量は GAPDH mRNA の発現量によって内部補正を行い、mock 処理時の値を基準値として変化量を測定した。結果は同様の実験を 3 回実施した平均値で示した。統計処理は Student t 検定により行った。

### 4-3. 結果と考察

#### 4-3-1. HsiRNA の末端構造と活性の関係

本章ではヒトの RNA polymerase II polypeptide A に対する siRNA (siPol)をモデルとして使用した。初めに、RNA ガイド鎖に対して完全に相補的な DNA パッセンジャー鎖をもつ HsiRNA を設計し活性を測定したところ、その活性は 2 本鎖 RNA である siRNA に比べ極め

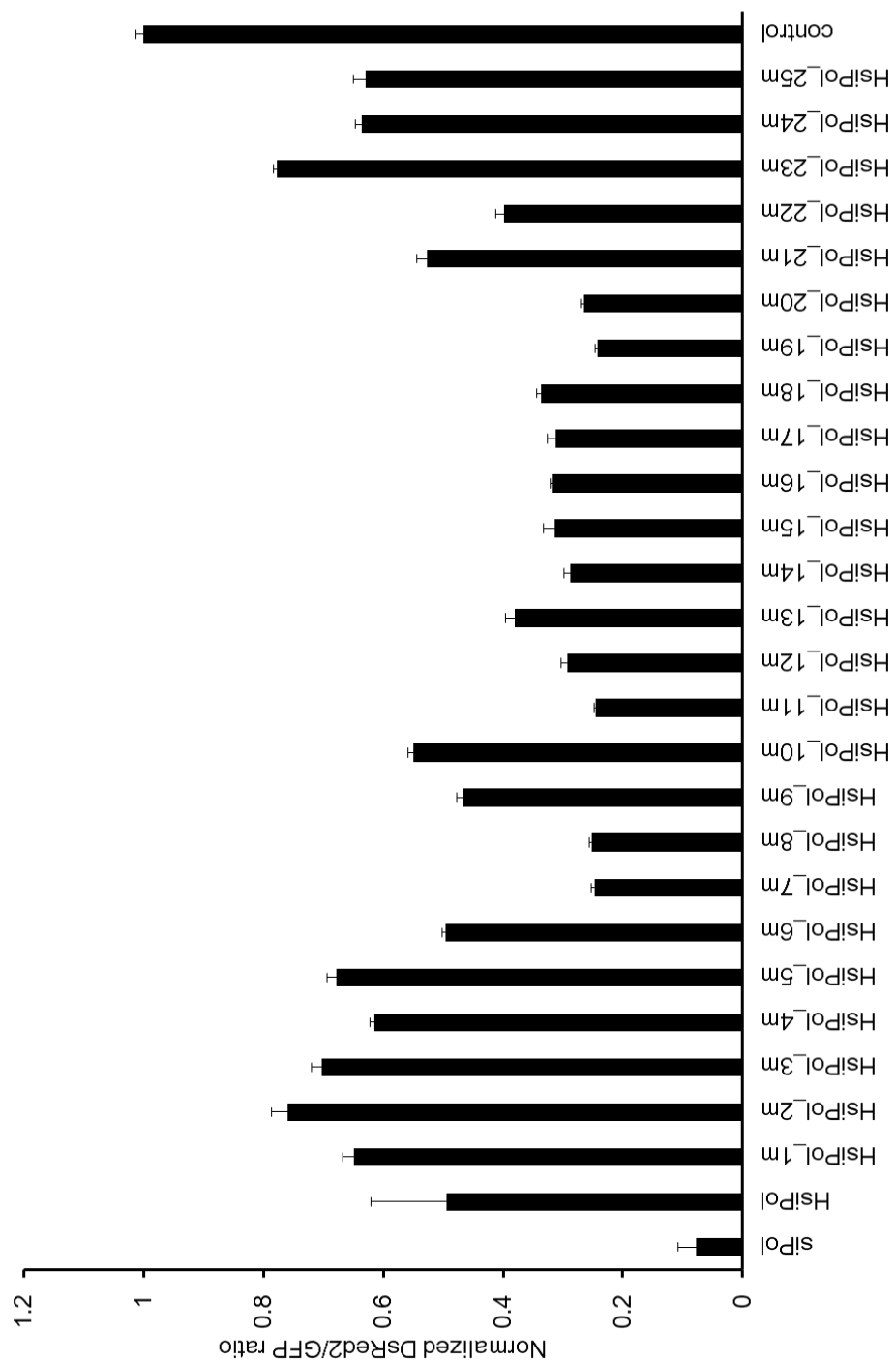
て低いものであった。同様の結果が Ui-Tei らによっても報告されている<sup>(11)</sup>。RNA/DNA2 本鎖は RISC 構成タンパク質である TRBP や PACT に認識されない<sup>(11, 16)</sup>。そのため、HsiRNA の RISC への取り込みが起こりにくく活性が低下すると考えられている。

siRNA にミスマッチ塩基を導入すると RNAi 活性が向上することが報告されている<sup>(17, 18)</sup>。そこで HsiRNA にミスマッチ塩基を導入することで活性の向上を図った。Table 4-1 に示すような DNA パッセンジャー鎖の異なる位置にミスマッチ塩基をもつ HsiPol 変異体を作製し、レポータージーンアッセイにより活性の比較を行った (Fig 4-3)。

**Table 4-1.** ミスマッチを含む HsiRNA の DNA パッセンジャー鎖の配列

Name of HsiRNA	Sequence of DNA passenger strand (5' - 3')
HsiPol_1m	<b>T</b> AACGTTGAGGAAGGTGACTGCCAA
HsiPol_2m	C <b>T</b> ACGTTGAGGAAGGTGACTGCCAA
HsiPol_3m	CA <b>T</b> CGTTGAGGAAGGTGACTGCCAA
HsiPol_4m	CAAT <b>G</b> TTGAGGAAGGTGACTGCCAA
HsiPol_5m	CAAC <b>T</b> TTGAGGAAGGTGACTGCCAA
HsiPol_6m	CAACG <b>C</b> TGAGGAAGGTGACTGCCAA
HsiPol_7m	CAACGT <b>C</b> GAGGAAGGTGACTGCCAA
HsiPol_8m	CAACGTT <b>T</b> AGGAAGGTGACTGCCAA
HsiPol_9m	CAACGTTG <b>T</b> GGAAGGTGACTGCCAA
HsiPol_10m	CAACGTTGA <b>T</b> GAAGGTGACTGCCAA
HsiPol_11m	CAACGTTGAG <b>T</b> AAGGTGACTGCCAA
HsiPol_12m	CAACGTTGAGG <b>T</b> AGGTGACTGCCAA
HsiPol_13m	CAACGTTGAGGA <b>T</b> GGTGACTGCCAA
HsiPol_14m	CAACGTTGAGGAA <b>T</b> GTGACTGCCAA
HsiPol_15m	CAACGTTGAGGAAG <b>T</b> TGACTGCCAA
HsiPol_16m	CAACGTTGAGGAAGG <b>C</b> GACTGCCAA
HsiPol_17m	CAACGTTGAGGAAGGT <b>T</b> ACTGCCAA
HsiPol_18m	CAACGTTGAGGAAGGTG <b>T</b> CTGCCAA
HsiPol_19m	CAACGTTGAGGAAGGTGA <b>T</b> TGCCAA
HsiPol_20m	CAACGTTGAGGAAGGTGAC <b>C</b> GCCAA
HsiPol_21m	CAACGTTGAGGAAGGTGACT <b>T</b> CCTAA
HsiPol_22m	CAACGTTGAGGAAGGTGACTGT <b>C</b> TAA
HsiPol_23m	CAACGTTGAGGAAGGTGACTGCT <b>T</b> AA
HsiPol_24m	CAACGTTGAGGAAGGTGACTGCC <b>T</b> A
HsiPol_25m	CAACGTTGAGGAAGGTGACTGCCA <b>T</b>

※ 太字はミスマッチ塩基を表す



**Fig 4-3.** ミスマッチ導入による HsiRNA の活性変化

サンプルの濃度は全て 5 nM に合わせた。得られた DsRed2/GFP の値は、control siRNA 導入時に得られた値を基準として表した

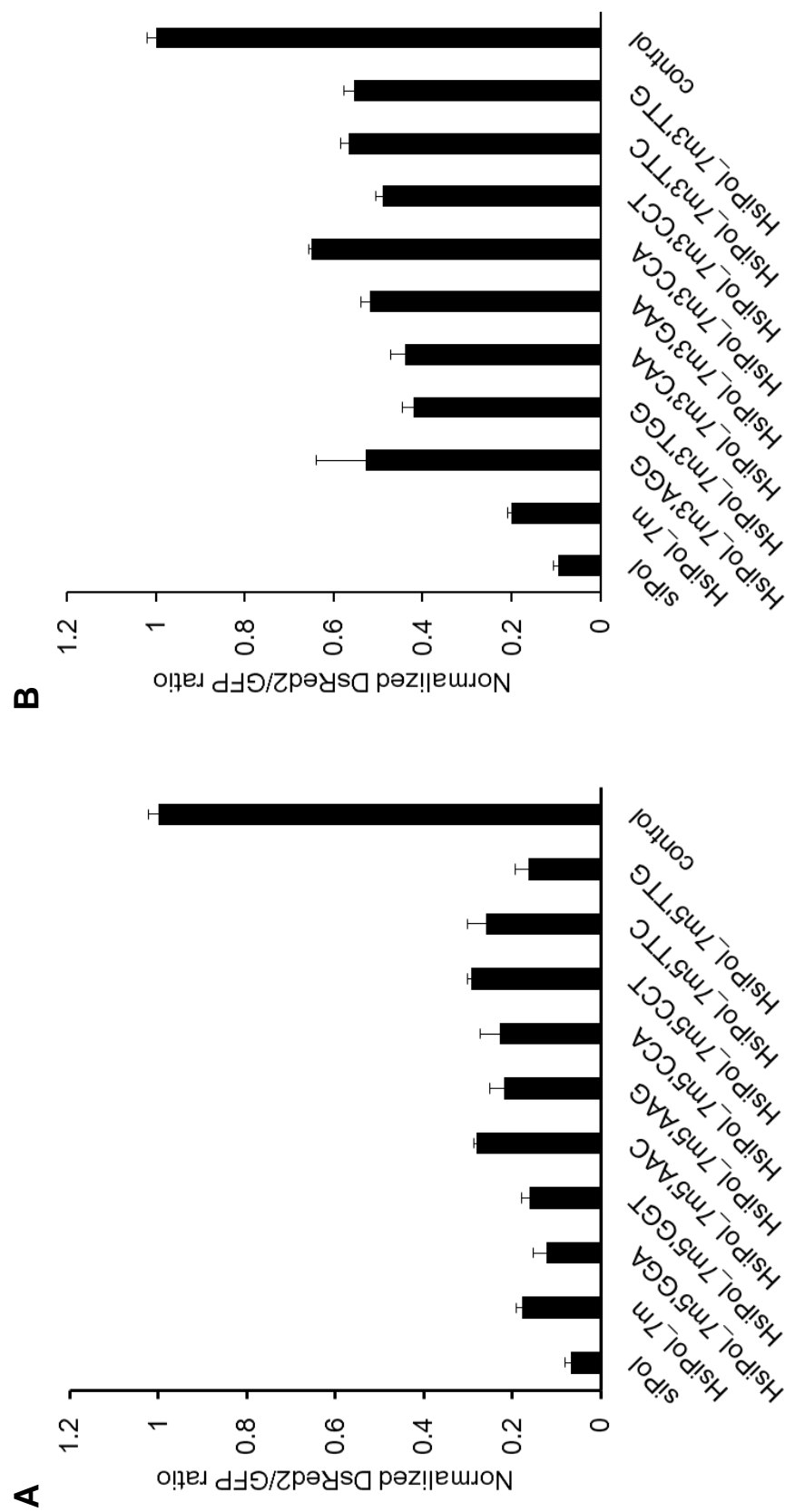


その結果ミスマッチの導入により HsiRNA の活性が大きく変化することが分かった。2 本鎖領域の両末端側にミスマッチが存在する場合には活性が低下し、中心に近い位置にミスマッチが存在する場合には活性が向上する傾向があった。中でも、HsiPol\_7m、HsiPol\_8m、HsiPol\_19m、HsiPol\_20m は特に高い活性を有していた。しかしながら、RNA2 本鎖からなる siPol に匹敵するほど高い活性を示す HsiRNA は得られなかった。

Sano ら<sup>(19)</sup>および Sun ら<sup>(20)</sup>は、短いパッセンジャー鎖を用いることで siRNA の活性が上昇することを報告した。そこで、DNA パッセンジャー鎖の長さを変化させることで HsiRNA の活性を高めることを試みた。ミスマッチを導入した HsiRNA の中で最も高い活性を示した HsiPol\_7m の 5'もしくは 3'末端に様々な配列の 6 塩基長の延長領域を付加した。それぞれの HsiRNA の名称と延長領域の塩基組成を Table 4-2 に示す。各 HsiRNA の活性をレポータージーンアッセイにより求めた結果を Fig 4-4 に示した。HsiPol\_7m がもつパッセンジャー鎖の 3'側に延長領域を付加した場合は、いずれも HsiPol\_7m よりも低い活性を示した (Fig 4-4A)。一方、5'側に延長領域を付加した場合には、いずれもそれほど活性が低下せず、HsiPol\_7m5'TGG および HsiPol\_7m5'AGG のような Grich な延長領域を有するものは、HsiPol\_7m より活性が高くなる傾向を示した (Fig 4-4B)。

**Table 4-2.** 6 塩基の 3'または 5'延長領域を有する HsiRNA の名称と延長塩基配列

Name of HsiRNA	Sequence of flanking region (5' - 3')
HsiPol_7m3' AGG	AGGAGG
HsiPol_7m3' TGG	TGGTGG
HsiPol_7m3' CAA	CAACAA
HsiPol_7m3' GAA	GAAGAA
HsiPol_7m3' ACC	ACCACC
HsiPol_7m3' TCC	TCCTCC
HsiPol_7m3' CTT	CTTCTT
HsiPol_7m3' GTT	GTTGTT
HsiPol_7m5' GGA	GGAGGA
HsiPol_7m5' GGT	GGTGGT
HsiPol_7m5' AAC	AACAAC
HsiPol_7m5' AAG	AAGAAG
HsiPol_7m5' CCA	CCACCA
HsiPol_7m5' CCT	CCTCCT
HsiPol_7m5' TTC	TTCTTC
HsiPol_7m5' TTG	TTGTTG



**Fig 4-4.** HsiRNA への延長領域の付加による活性変化

(A) DNA パッケージング鎖の 3' 末端に延長領域をもつ HsiRNA 変異体の活性を示した。得られた DsRed2/GFP の値は、control siRNA 導入時に得られた値を基準として表した。サンプルの濃度は全て 5 nM に合わせた。異体の活性を示した。

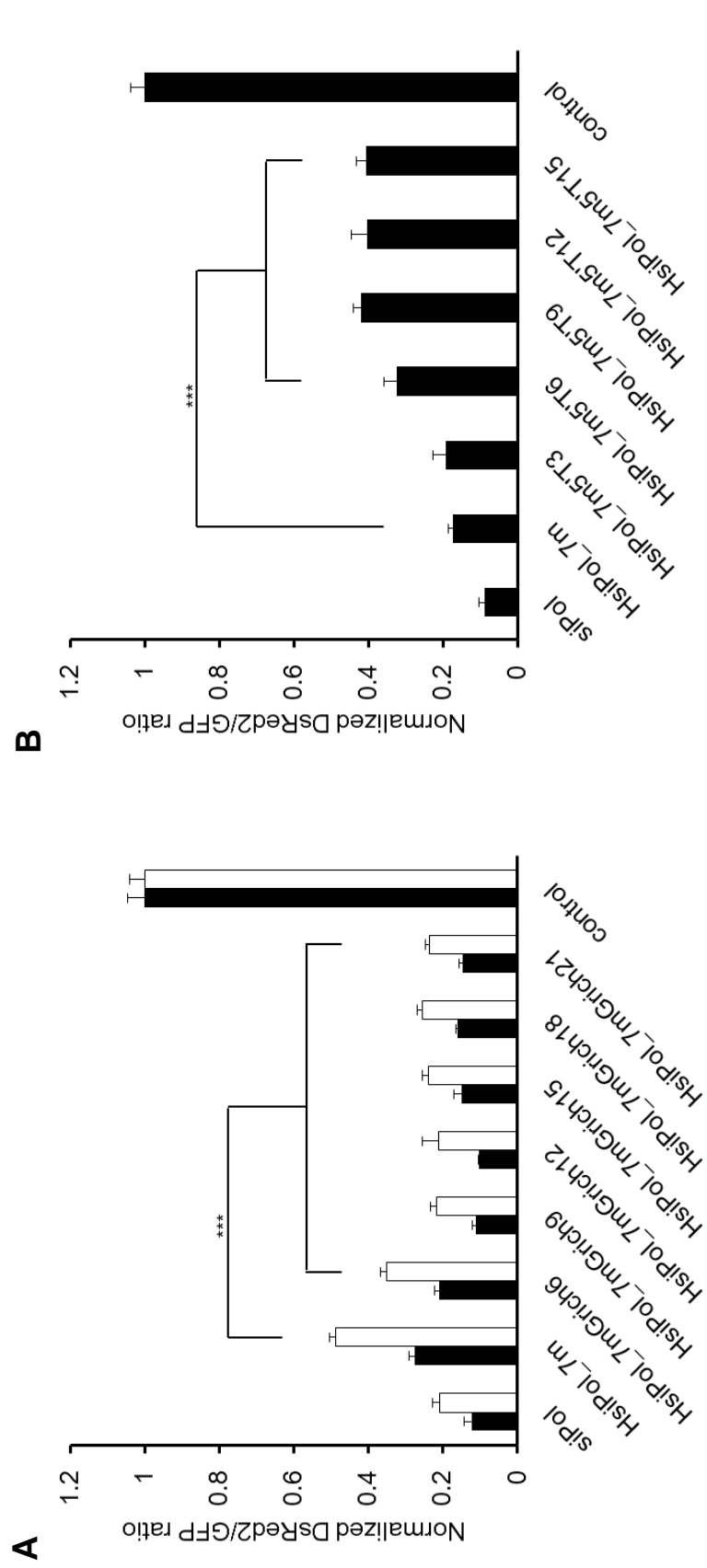
これらの結果から、DNA パッセンジャー鎖への延長領域の付加によって HsiRNA の構造が変化することで、RISC への取り込み効率が低下していることが示唆される。特に DNA パッセンジャー鎖の 3' 側に延長配列をもつ HsiRNA の構造は、極めて RISC に取り込まれにくいものであると考えられる。

#### 4-3-2. Grich 配列の付加による RNAi 活性の向上

Fig 4-4 の結果から、5' 延長領域のグアニンが HsiRNA の活性を向上させる効果を有することが考えられる。そこで、Table 4-3 に示すような 6 - 21 塩基長の Grich 配列をもつ 5' 延長型 HsiPol\_7m を作製した。Fig 4-4 に示した HsiPol\_7m5'AGG を以後 HsiPol\_7mGrich6 と表記する。グアニンは配置の仕方によっては G カルテットのような強固な構造をとる可能性がある<sup>(21)</sup>。そこで、構造体を形成しない(5'-GAGGGA-3')という配列を基本単位として、延長領域の設計を行った。また 5' 延長領域を全てチミンで構成したものも設計し、比較対象として用いた。新しく設計した延長型 HsiRNA は延長領域の塩基数 (x) に応じて HsiPol\_7mGrichx または HsiPol\_7mTx と表記する。レポータージーンアッセイを用いた活性比較実験の結果を Fig 4-4 にまとめた。全ての Grich 延長型 HsiPol\_7m が HsiPol\_7m よりも高い活性を示した。その中でも HsiPol\_7mGrich9 および HsiPol\_7mGrich12 の活性は、2 本鎖 RNA である siPol の活性と同等であった (Fig 4-5A)。一方、チミンのみで延長領域を構成した場合には活性促進効果は得られなかった。これらのことから、DNA パッセンジャー鎖の 5' 側への延長配列の付加による HsiRNA の活性促進効果はグアニン含有率が高いほど大きく、また延長塩基数が 9-12 塩基程度の場合に最も高い効果を示すことが明らかになった (Fig 4-5B)。

**Table 4-3.** 長さの異なる 5' 延長配列を有する HsiRNA の名称と延長塩基配列

Name of HsiRNA	Sequence of flanking region (5' - 3')
HsiPol_7mGrich6	GGAGGA
HsiPol_7mGrich9	GAGGGAGAG
HsiPol_7mGrich12	GGAGAGGGAGAG
HsiPol_7mGrich15	GAGGGAGAGGGAGAG
HsiPol_7mGrich18	GGAGAGGGAGAGGGAGAG
HsiPol_7mGrich21	GAGGGAGAGGGAGAGGGAGAG
HsiPol_7m5' T3	TTT
HsiPol_7m5' T6	TTTTTT
HsiPol_7m5' T9	TTTTTTTTT
HsiPol_7m5' T12	TTTTTTTTTTTTT
HsiPol_7m5' T15	TTTTTTTTTTTTTTTTT



**Fig 4-5.** Grich 延長配列の HsiRNA 活性への影響

(A) DNA パッケージング鎖の 5' 末端に Grich 延長領域をもつ HsiRNA の活性を示した。 (B) DNA パッケージング鎖の 5' 側に T 延長領域をもつ HsiRNA の活性を示した。得られた DsRed2/GFP の値は、control siRNA 導入時に得られた値を基準として表した。サンプル濃度は (■) 5 nM、(□) 2.5 nM に合わせた。\*\*\*p < 0.001。

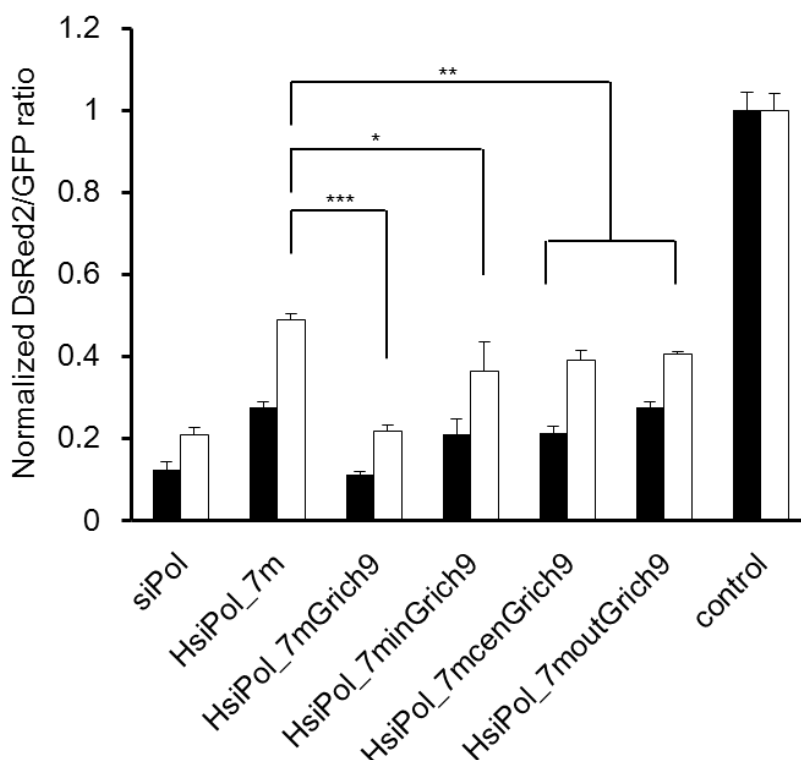
次に延長領域における Grich 配列の位置が HsiRNA の活性にどう影響するかを調べた。Fig 4-6A に示すように優れた活性促進効果を示した配列(5' - GAGGGAGAG - 3')を、21 塩基長の延長領域の 3'側・中心・5'側と異なった位置に含む Grich 延長型 HsiPol\_7m を作製した。また非 Grich 領域は AAC の繰り返し配列で構成した。これらの活性をレポータージーンアッセイにより測定した。Fig 4-6B に示すように新しく設計した HsiPol\_7minGrich9、HsiPol\_7mcenGrich9、HsiPol\_7moutGrich9 の活性には大きな差が見られず、Grich 配列の含まれる位置は活性促進効果に対し、ほとんど影響しないことがわかった。また、これらの活性が HsiPol\_7mGrich9 の活性よりも低かったことから、延長領域内における非 Grich 配列

## A

Name of HsiRNA	Sequence of flanking region (5' - 3')
HsiPol_7minGrich9	AACAACAACAAC <b>GAGGGAGAG</b>
HsiPol_7mcenGrich9	AACAAC <b>GAGGGAGAG</b> AACAAC
HsiPol_7moutGrich9	<b>GAGGGAGAG</b> AACAACAACAAC

※Grich 領域を太字で表した

## B



**Fig 4-6.** Grich 配列の位置の HsiRNA 活性への影響

(A) 各延長型 HsiRNA の延長配列を示した。(B) レポータージーンアッセイにより活性を測定した。得られた DsRed2/GFP の値は、ctrl siRNA 導入時に得られた値を基準として表した。サンプル濃度は (■) 5 nM、(□) 2.5 nM に合わせた。\*P < 0.05、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001。

は、Grich 配列による HsiRNA の活性促進効果を妨げる可能性が考えられた。延長領域付加によって高い活性促進効果を得るためには、延長領域全体を Grich な配列で構成することが必須であると思われる。

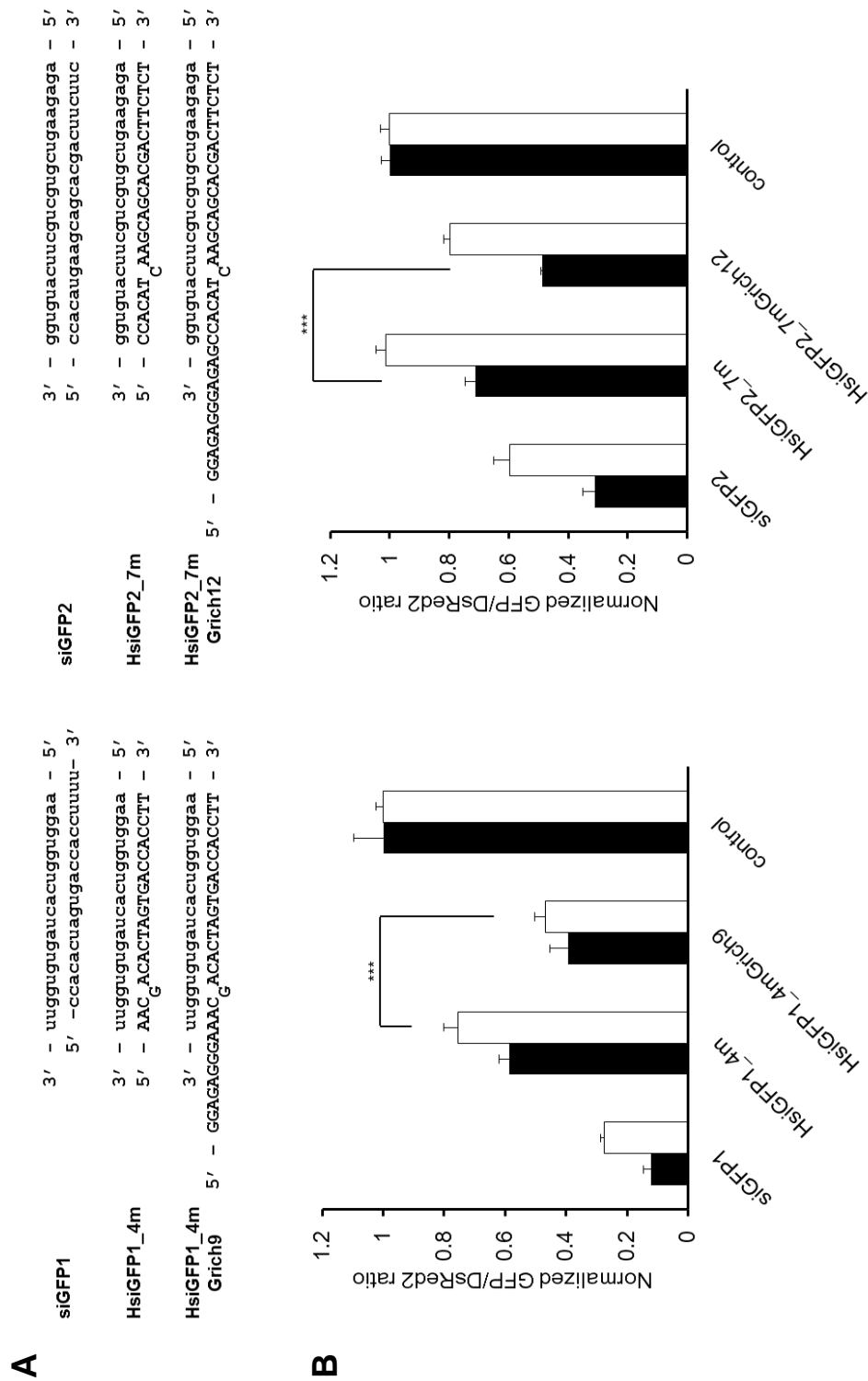
最近の報告において細胞内の Ago2 が Grich 配列と相互作用することが示唆されている<sup>(22, 23)</sup>。それゆえ、延長領域に存在する Grich 配列が HsiRNA と Ago2 の会合を促進することで、HsiRNA の RISC への取り込みを促している可能性が考えられる。

#### 4-3-3. GFP に対する延長型 HsiRNA

これまで PolR2 に対する HsiRNA を使用して、Grich 延長領域の付加による HsiRNA の活性改善を行ってきた。次に GFP に対する HsiRNA を作製し、Grich 延長配列付加の効果を検討した。HsiRNA は siGFP1 と siGFP2 という 2 種類の siRNA を基に作成した(Fig 4-7A)。これらの siRNA はそれぞれ GFP mRNA の異なった位置を標的とする。また構造にも違いがあり、siGFP1 は 21 塩基長の 2 本鎖 RNA であり両 3' 末端に 2 つの突出塩基を有している。siGFP2 は 25 塩基長の二本鎖 RNA であり、5'、3' 側ともに平滑末端である。HsiGFP1\_4m および HsiGFP2\_7m は、これらの siRNA を基に作製されており、それぞれ DNA パッセンジャー鎖の 5' 末端から 4 番目、7 番目の位置にミスマッチ塩基を含んでいる。Fig 4-7 B に示すように HsiGFP1\_4m および HsiGFP2\_7m の活性は元の siRNA より低かった。これらに 9 塩基もしくは 12 塩基の Grich 延長配列を付加したところ、どちらの HsiRNA も活性が上昇したが、元の siRNA の活性には達しなかった。このことから、Grich 延長領域の付加による活性化効果は HsiRNA の種類を問わず起こると考えられる。しかしながら、ヘテロ化による活性低下の度合いは基となる siRNA の塩基配列に依存する。そのため、siRNA と同等の高い活性をもつ延長型 HsiRNA を得るためには、ヘテロ化による活性低下を最小限に抑えられる 2 本鎖配列を探索する必要がある。

#### 4-3-4. 延長型 HsiRNA のインターフェロン応答性

生体内に 2 本鎖 RNA を導入するとインターフェロン応答が誘導され、それに伴う非特異的な遺伝子発現阻害やアポトーシスが起きることが知られている。そのため siRNA を薬剤として生体内に導入した場合にも、全身でインターフェロン応答が誘導され副作用の原因となる。この問題は siRNA 医薬品の開発を目指す上で非常に大きな障壁となっている。2 本鎖 RNA 依存性のインターフェロン応答反応は、TLR3 などの免疫応答に関わるタンパク質に二本鎖 RNA が結合することで誘導される<sup>(24)</sup>。それゆえ RNA と DNA からなる HsiRNA を使用すれば、2 本鎖 RNA 依存性のインターフェロン応答を回避することが出来るのではないかと考えた。実際に、siRNA の一部を DNA に置換することでインターフェロン応答を軽減できたという報告もある<sup>(11)</sup>。



**Fig 4-7.** GFP を標的とする延長型 HsiRNA の活性比較

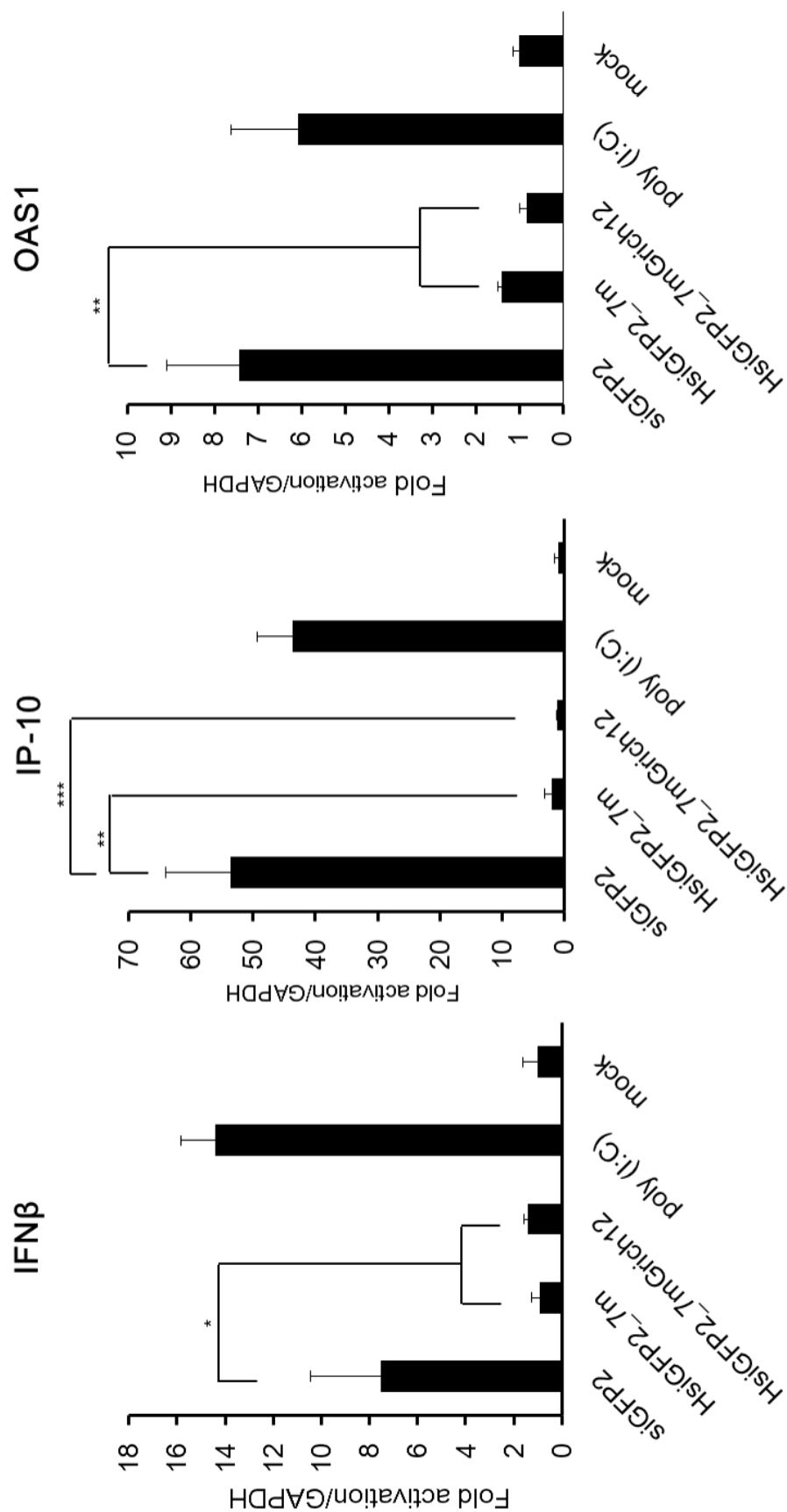
(A) 2 種類の GFP に対する siRNA および HsiRNA の配列と構造を示した。(B) レポータージェンアッセイにより活性の比較を行った。得られた GFP/DsRed2 の値は、ctrl siRNA 導入時に得られた値を基準として表したサンプル濃度は(■) 5 nM、(□) 2.5 nM に合わせた。\*\*\*P < 0.001。

HeLa S3 細胞を用いて HsiRNA によるインターフェロン応答を調べた。この細胞は、siRNA が導入された際に様々な免疫応答性タンパク質を発現することが知られている<sup>(25-27)</sup>。siRNA の導入による内在性 mRNA への影響を軽減するため、ヒトの細胞内には存在しない GFP に対する HsiRNA である HsiGFP2\_7m、そして HsiGFP\_7mGrich12 を使用した。またポジティブコントロールとして、短鎖 2 本鎖 RNA である siGFP2 および 2 本鎖 RNA アナログである poly (I:C) を使用した。poly (I:C) は TLR3 の基質であり、インターフェロン応答を強く誘導することが知られている<sup>(27)</sup>。

HeLa S3 細胞に各サンプルを導入し、9 時間後の IFN $\beta$  及びインターフェロン応答性タンパク質である IP-10<sup>(28, 29)</sup>、OAS1<sup>(30)</sup> の mRNA 量を qRT-PCR 法により解析した。これらはインターフェロン応答のマーカー遺伝子として知られている。Fig 4-8 に示すように、siGFP2 もしくは poly (I:C) を導入した細胞では mock 処理した場合と比較して、各遺伝子の mRNA 量が有意に増加した。一方、HsiGFP2\_7m または HsiGFP2\_7mGrich12 を導入した細胞では、マーカー遺伝子の mRNA 量が mock 処理した場合と変わらなかった。以上のように RNA/DNA ハイブリッド 2 本鎖ではインターフェロン応答がほとんど起こらないことが明らかになった。

このように延長型 HsiRNA は従来の siRNA に匹敵する高い活性を持つ上に、副作用を引き起こす確率が極めて低い非常に優れたツールである。さらに研究を進めることで、siRNA 医薬の実現に大きく貢献できるのではないかと考えられる。





**Fig 4-8.** 延長型 HsiRNA のインターフェロン応答性

HeLa S3 細胞に対して 30 nM の siRNA、30 nM の HsiRNA、100 ng の poly (I : C) のいずれかを導入した。9 時間後における各遺伝子の発現量を qRT-PCR 法を用いて測定した。\*P < 0.05、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001。

#### 4-4. 参考文献

1. **Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C.:** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811 (1998).
2. **Vaishnaw, A. K., Gollob, J., Gamba-Vitalo, C., Hutabarat, R., Sah, D., Meyers, R., de Fougerolles, T., and Maraganore, J.:** A status report on RNAi therapeutics. *Silence*, **1**, 14 (2010).
3. **Kleinman, M. E., Yamada, K., Takeda, A., Chandrasekaran, V., Nozaki, M., Baffi, J. Z., Albuquerque, R. J., Yamasaki, S., Itaya, M., Pan, Y., and other 12 authors:** Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*, **452**, 591-597 (2008).
4. **Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F., and Kay, M. A.:** Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, **441**, 537-541 (2006).
5. **Khan, A. A., Betel, D., Miller, M. L., Sander, C., Leslie, C. S., and Marks, D. S.:** Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol*, **27**, 549-555 (2009).
6. **Clark, P. R., Pober, J. S., and Kluger, M. S.:** Knockdown of TNFR1 by the sense strand of an ICAM-1 siRNA: dissection of an off-target effect. *Nucleic Acids Res*, **36**, 1081-1097 (2008).
7. **Cho, W. G., Albuquerque, R. J., Kleinman, M. E., Tarallo, V., Greco, A., Nozaki, M., Green, M. G., Baffi, J. Z., Ambati, B. K., De Falco, M., and other 4 authors:** Small interfering RNA-induced TLR3 activation inhibits blood and lymphatic vessel growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 7137-7142 (2009).
8. **Robbins, M., Judge, A., and MacLachlan, I.:** siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides*, **19**, 89-102 (2009).
9. **Chang, C. I., Yoo, J. W., Hong, S. W., Lee, S. E., Kang, H. S., Sun, X., Rogoff, H. A., Ban, C., Kim, S., Li, C. J., and Lee, D. K.:** Asymmetric shorter-duplex siRNA structures trigger efficient gene silencing with reduced nonspecific effects. *Mol Ther*, **17**, 725-732 (2009).
10. **Dua, P., Yoo, J. W., Kim, S., and Lee, D. K.:** Modified siRNA structure with a single nucleotide bulge overcomes conventional siRNA-mediated off-target silencing. *Mol Ther*, **19**, 1676-1687 (2011).

11. **Ui-Tei, K., Naito, Y., Zenno, S., Nishi, K., Yamato, K., Takahashi, F., Juni, A., and Saigo, K.:** Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. *Nucleic Acids Res*, **36**, 2136-2151 (2008).
12. **Jackson, A. L., Burchard, J., Leake, D., Reynolds, A., Schelter, J., Guo, J., Johnson, J. M., Lim, L., Karpilow, J., Nichols, K., and other 3 authors:** Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *Rna*, **12**, 1197-1205 (2006).
13. **Judge, A. D., Bola, G., Lee, A. C., and MacLachlan, I.:** Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther*, **13**, 494-505 (2006).
14. **Cekaite, L., Furset, G., Hovig, E., and Sioud, M.:** Gene expression analysis in blood cells in response to unmodified and 2'-modified siRNAs reveals TLR-dependent and independent effects. *J Mol Biol*, **365**, 90-108 (2007).
15. **Behlke, M. A.:** Chemical modification of siRNAs for in vivo use. *Oligonucleotides*, **18**, 305-319 (2008).
16. **Gredell, J. A., Dittmer, M. J., Wu, M., Chan, C., and Walton, S. P.:** Recognition of siRNA asymmetry by TAR RNA binding protein. *Biochemistry*, **49**, 3148-3155 (2010).
17. **Hohjoh, H.:** Enhancement of RNAi activity by improved siRNA duplexes. *FEBS Lett*, **557**, 193-198 (2004).
18. **Wu, H., Ma, H., Ye, C., Ramirez, D., Chen, S., Montoya, J., Shankar, P., Wang, X. A., and Manjunath, N.:** Improved siRNA/shRNA functionality by mismatched duplex. *PLoS One*, **6**, e28580 (2011).
19. **Sano, M., Sierant, M., Miyagishi, M., Nakanishi, M., Takagi, Y., and Sutou, S.:** Effect of asymmetric terminal structures of short RNA duplexes on the RNA interference activity and strand selection. *Nucleic Acids Res*, **36**, 5812-5821 (2008).
20. **Sun, X., Rogoff, H. A., and Li, C. J.:** Asymmetric RNA duplexes mediate RNA interference in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, **26**, 1379-1382 (2008).
21. **Hazel, P., Huppert, J., Balasubramanian, S., and Neidle, S.:** Loop-length-dependent folding of G-quadruplexes. *J Am Chem Soc*, **126**, 16405-16415 (2004).
22. **Leung, A. K., Young, A. G., Bhutkar, A., Zheng, G. X., Bosson, A. D., Nielsen, C. B., and Sharp, P. A.:** Genome-wide identification of Ago2 binding sites from mouse embryonic stem cells with and without mature microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 237-244 (2011).
23. **Taliaferro, J. M., Aspden, J. L., Bradley, T., Marwha, D., Blanchette, M., and Rio, D. C.:** Two new and distinct roles for *Drosophila* Argonaute-2 in the nucleus: alternative pre-mRNA splicing and transcriptional repression. *Genes Dev*, **27**, 378-389 (2013).

24. **Olejniczak, M., Galka-Marciniak, P., Polak, K., Fligier, A., and Krzyzosiak, W. J.:** RNAimmuno: a database of the nonspecific immunological effects of RNA interference and microRNA reagents. *Rna*, **18**, 930-935 (2012).
25. **Weber, C., Muller, C., Podszuweit, A., Montino, C., Vollmer, J., and Forsbach, A.:** Toll-like receptor (TLR) 3 immune modulation by unformulated small interfering RNA or DNA and the role of CD14 (in TLR-mediated effects). *Immunology*, **136**, 64-77 (2012).
26. **Persengiev, S. P., Zhu, X., and Green, M. R.:** Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *Rna*, **10**, 12-18 (2004).
27. **Vitali, P. and Scadden, A. D.:** Double-stranded RNAs containing multiple IU pairs are sufficient to suppress interferon induction and apoptosis. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 1043-1050 (2010).
28. **Taima, K., Imaizumi, T., Yamashita, K., Ishikawa, A., Fujita, T., Yoshida, H., Takanashi, S., Okumura, K., and Satoh, K.:** Expression of IP-10/CXCL10 is upregulated by double-stranded RNA in BEAS-2B bronchial epithelial cells. *Respiration*, **73**, 360-364 (2006).
29. **Merkle, M., Sauter, M., Ribeiro, A., Mussack, T., Ladurner, R., Sitter, T., and Wornle, M.:** Synthetic double-stranded RNA stimulates the expression of interferon-inducible protein 10 in human mesothelial cells. *Clin Vaccine Immunol*, **18**, 176-179 (2011).
30. **Perelygin, A. A., Zharkikh, A. A., Scherbik, S. V., and Brinton, M. A.:** The mammalian 2'-5' oligoadenylate synthetase gene family: evidence for concerted evolution of paralogous Oas1 genes in Rodentia and Artiodactyla. *J Mol Evol*, **63**, 562-576 (2006).

# 第 5 章

## 腫瘍抑制能を有する miRNA、 miR-143 の高活性化

## 5-1. 緒言

がんの発生・維持に miRNA が深く関わっていることが明らかになり、miRNA を利用した腫瘍増殖抑制法について活発な研究が為されている。正常細胞ががん化する際に特定の miRNA の急激な増加または減少が起きる<sup>(1)</sup>。このような miRNA の中には腫瘍の増殖・転移に大きく関わるものが存在し、これらを治療標的とすることで有効ながん治療法の確立につながると期待されている<sup>(2)</sup>。がん細胞で過剰に発現している miRNA を標的とする場合には、第 2 章で創製した LidNA のような miRNA inhibitor を使用する手法が有効である。それとは別に、がん化する際に発現が抑制されてしまった miRNA を外部から補充する手法も存在する。がん細胞で発現が抑制されている miRNA の中には細胞周期調節やアポトーシス誘導に関わるものが多く含まれており、これらを外部から導入することで人為的に細胞増殖抑制を誘導できる<sup>(3, 4)</sup>。すでに多くの miRNA 補充法が開発されており、医薬品としての実用化が待ち望まれている。miRNA 補充法を用いる大きな利点として、副作用の心配が少ない事が挙げられる。補充する miRNA は正常細胞内で豊富に存在する物なので、生体内に投与した際に予期せぬ反応が起きる可能性が極めて低い。

miR-143 は抗腫瘍効果をもつ miRNA の一種である。当初は大腸がんに対して増殖抑制効果を示すことで注目を集めていたが、研究が進むにつれ様々ながんに対して増殖または転移を抑制する効果をもつことが明らかになった<sup>(5-9)</sup>。miR-143 の標的には K-Ras や ERK5 などの MAP キナーゼ経路に関わるタンパク質が含まれている。そのため、がん細胞に miR-143 を導入すると MAP キナーゼ経路を不活性化し、がんの異常増殖を停止することが出来る。本章では、第 4 章で得た知見を基に miR-143 を高活性化し、それを利用した高効率な腫瘍増殖抑制法の開発に取り組んだ。

## 5-2. 材料と方法

### 5-2-1. 細胞培養

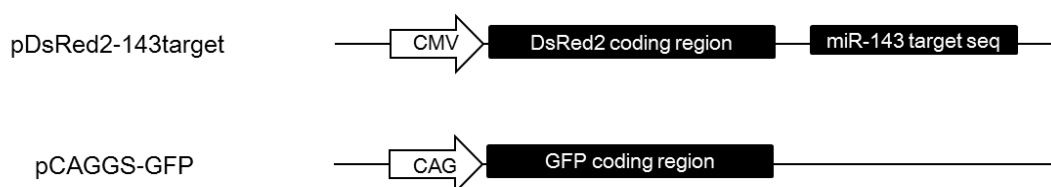
ヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞、ヒト子宮頸がん由来 HeLa S3 細胞およびヒト膀胱がん由来 MIA PaCa-2 細胞はウシ胎児血清(FBS) (CCB)、100 units/mL penicillin G (Wako)および 100 µg/mL streptomycin (Wako)添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wako)を用いて培養した。

### 5-2-2. miRNA の調製

使用した RNA および RNA/DNA キメラの化学合成は Sigma 社に依頼した。また使用した DNA の合成は Greiner 社に依頼した。トランスフェクションを行う直前に、第 4 章と同じ手順で 2 本鎖を形成させた。

### 5-2-3 レポータージーンアッセイ

赤色蛍光タンパク質である DsRed2 の発現ベクターである pDsRed2-C1 が持つ DsRed2 遺伝子の 3'-UTR に、miR-143 の標的となる配列を組み込んだ(Fig 5-1)。得られたプラスミドは pDsRed2-143target と表記する。核酸の細胞へのトランスフェクションは X-tremeGENE siRNA (Roche)を用いて製造会社のプロトコール通りに行った。HEK293T 細胞を  $1.0 \times 10^4$  cells/well の濃度で 96 穴プレートに播種し、一晚培養を行った。16 - 24 時間後、20 ng の pDsRed2-143target、20ng の pCAGGS-GFP、各濃度の miRNA を同時に細胞内へ導入した。ネガティブコントロールとしてヒトの遺伝子発現を妨げない control siRNA (5' - GCGCGUUUGUAGGAUUCG - 3') を使用した。トランスフェクション実施から 48 時間後に第 4 章と同じ手順で蛍光値を測定した。結果は同様の実験を 3 回実施した平均値で示した。



**Fig 5-1.** レポーター遺伝子の構成

DsRed2 遺伝子の 3'-UTR に miR-143 の相補配列が含まれている。DsRed2 mRNA は CMV プロモーターから、GFP mRNA は CAG プロモーターから転写される。

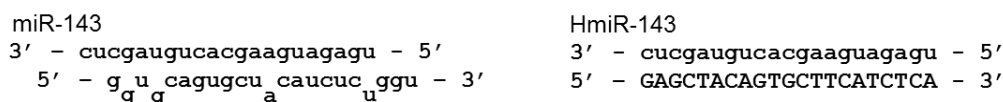
### 5-2-4. 細胞増殖測定

HeLa S3 細胞または MIA PaCa-2 細胞を、 $6.0 \times 10^3$  cells/well の濃度で 96 穴プレートに播種し、一晚培養を行った。16 - 24 時間後、miRNA を 40 nM の濃度で X-tremeGENE siRNA を用いて製造会社のプロトコール通りに導入した。ネガティブコントロールとして control siRNA を使用した。トランスフェクション実施から 48 時間後に培養上清を除き、新しい培地を加え静置培養を行った。30 分後 Cell Counting Kit-8 solution を 1 穴あたり 10  $\mu$ l 添加し、プレートを静かに揺らすことで混合した。反応後、プレートリーダーを用いて 450 nm における吸光度を測定し細胞増殖能を評価した。結果は同様の実験を 3 回実施した平均値で示した。

## 5-3. 結果

### 5-3-1. Hetero miRNA の作製と活性

天然型の miRNA は miRNA/miRNA\*2 本鎖構造である<sup>(10)</sup>。本章では第 4 章で得た知見を基にし、miRNA\*鎖を全て DNA で置換した miRNA/miDNA\*構造をもつ hetero miRNA (HmiRNA)を設計した。Fig 5-2 に示すように、天然型の miR-143 は分子内に 4 つのミスマッチ部位と両 3'末端に突出塩基を持つ。本章で作製した標準型 HmiR-143 は、両端が平滑末端である完全相補的な RNA/DNA 二本鎖構造である。



**Fig 5-2.** miR-143 および HmiR-143 の配列と構造

小文字は RNA、大文字は DNA を表している。上側が miRNA 鎖、下側が miRNA\*鎖または miDNA\*鎖である。

第 4 章において DNA パッセンジャー鎖の適切な位置に 1 塩基ミスマッチが含まれる場合に、HsiRNA の活性が高まることを示した。このことから、HmiR-143 に対して適切な位置にミスマッチ塩基を導入することで高い活性を与えられると推察できる。miDNA\*鎖の 5' 末端から 4 番目の位置にミスマッチを持つ HmiR-143\_4m、12 番目の位置にミスマッチを持つ HmiR-143\_12m、18 番目の位置にミスマッチを持つ HmiR-143\_18m を設計した (Table 5-1)。それぞれのミスマッチ塩基の位置は、天然型 miR-143 がもつミスマッチ塩基の位置に合わ

**Table 5-1.** ミスマッチを含む HmiR-143 変異体の miDNA\*鎖の配列

Name of HmiRNA	Sequence of miDNA* strand (5' - 3')
HmiR-143	GAGCTACAGTGCTTCATCTCA
HmiR-143_4m	GAG <b>G</b> TACAGTGCTTCATCTCA
HmiR-143_12m	GAGCTACAGTG <b>G</b> TTCATCTCA
HmiR-143_18m	GAGCTACAGTGCTTCAT <b>G</b> TCA
HmiR-143_4-12m	GAG <b>G</b> TACAGTG <b>G</b> TTCATCTCA
HmiR-143_4-18m	GAG <b>G</b> TACAGTGCTTCAT <b>G</b> TCA
HmiR-143_12-18m	GAGCTACAGTG <b>G</b> TTCAT <b>G</b> TCA

※太字はミスマッチ塩基を示している。

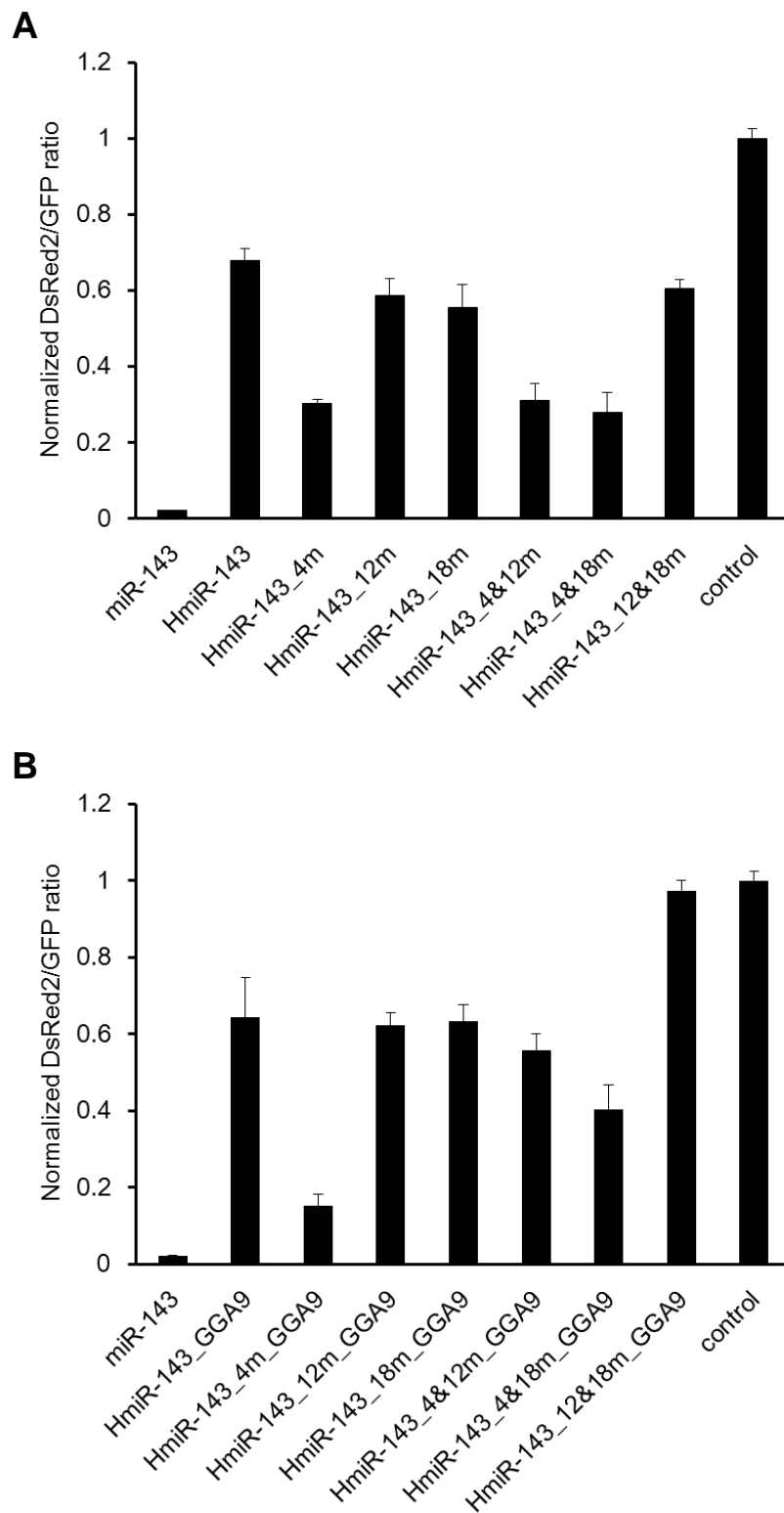


せて選択した。さらに、これらのミスマッチ塩基を組み合わせることにより、2本鎖領域内に2つのミスマッチ塩基を有する HmiR-143\_4-12m、HmiR-143\_4-18m、HmiR-143\_12-18m を作製した (Table 5-1)。HmiR-143 変異体の活性測定はレポータージーンアッセイにより行った。用いたプラスミドは活性測定用の pDsRed2-143target および導入効率補正用の pCAGGS-GFP である。pDsRed2-143target は DsRed2 遺伝子の 3'-UTR に miR-143 のターゲット配列が組み込まれている。これらのプラスミドと miR-143 もしくは HmiR-143 を同時に HEK293T 細胞へ導入した。48 時間後に細胞を溶解し蛍光量を測定した。Fig 5-3A に示すように、miDNA\*鎖の 5'末端から 4 番目の位置にミスマッチ塩基をもつ HmiR-143\_4m、HmiR-143\_4-12m、HmiR-143\_4-18 が高い活性を示した。4 番目の位置にミスマッチ塩基を持たない HmiR-143\_12m、HmiR-143\_18m、HmiR-143\_12-18m の活性は、標準型である HmiR-143 の活性と同等であり、ミスマッチ塩基導入による活性の改善は見られなかった。このように、miDNA\*鎖の 5'末端から 4 番目の位置にミスマッチを導入することで HmiR-143 の活性を高めることが出来たが、これらの活性は天然型 miRNA よりも低いものであった。

### 5-3-2. 延長領域の付加による HmiR-143 の高活性化

第 4 章において、DNA パッセンジャー鎖の 5'末端への延長領域の付加により HsiRNA の活性が向上することが示された。そこで HmiR-143 の miDNA\*鎖に対して同様の 5'延長領域を付加することで、高活性化を行えないかと考えた。Fig 5-3A に示した HmiR-143 変異体を持つ miDNA\*鎖の 5'末端に、Grich な延長配列(5' - GAGGGAGAG - 3') を付加することで活性が変化するかを、レポータージーンアッセイにより調べた。Fig 5-3B に示すように、HmiR-143\_4m に延長領域を付加した場合にのみ活性の改善が確認できた。ミスマッチ塩基をもたない HmiR-143、もしくは miDNA\*鎖の 5'末端から 4 番目以外の位置に 1 つのミスマッチ塩基をもつ HmiR-143\_12m および HmiR-143\_18m に対して延長領域を付加した場合には、活性の変化は起こらなかった。また二つのミスマッチ塩基をもつ HmiR-143\_4-12m、HmiR-143\_4-18m、HmiR-143\_12-18m に延長領域を付加した場合には、活性の著しい低下が起こった。

第 4 章および Fig 5-3 で使用した延長配列は、(5' - GAGGGA - 3')の繰り返し配列を用いて作製したものであった。ここでは、異なった延長配列をもつ 5 種類の延長型 HmiR-143\_4m を作製し、それぞれの活性を比較した。Table 5-2 に新しく設計した延長型 HmiR-143\_4m がもつ延長領域の配列を示した。カッコ内の数字は延長領域の塩基数を表している。Long1(12)は第四章において最も高い効果を示した延長領域をもつ。Long2(16)、Long3(14)は G 含有率の高いランダム配列により構成された延長領域を持つ。一方、Long4(17)、Long5(17)は G 含有率の低いランダム配列により構成された延長領域を持つ。活性の比較はレポータージーンアッセイにより行った。Fig 5-4A に示すように、全ての延長型 HmiR-143\_4m が HmiR-143\_4m よりも高い活性を示し、中でも Long2 (16)が最も高い活性をもつことが明らかになった。延長配列の効果により HmiR-143\_4m の活性が高まっていることを確認するた

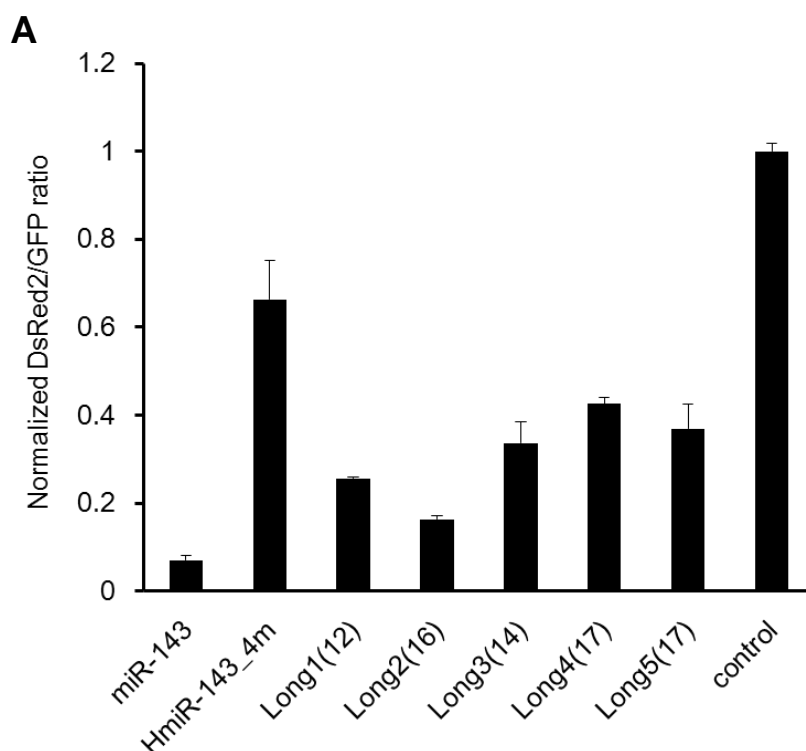


**Fig 5-3.** 異なる位置にミスマッチをもつ HmiR-143 および延長型 HmiR-143 の活性  
レポータージーンアッセイにより異なる位置にミスマッチをもつ HsiRNA (A)および延長型 HsiRNA (B)の活性を測定した。サンプルの濃度は 2 nM に合わせた。

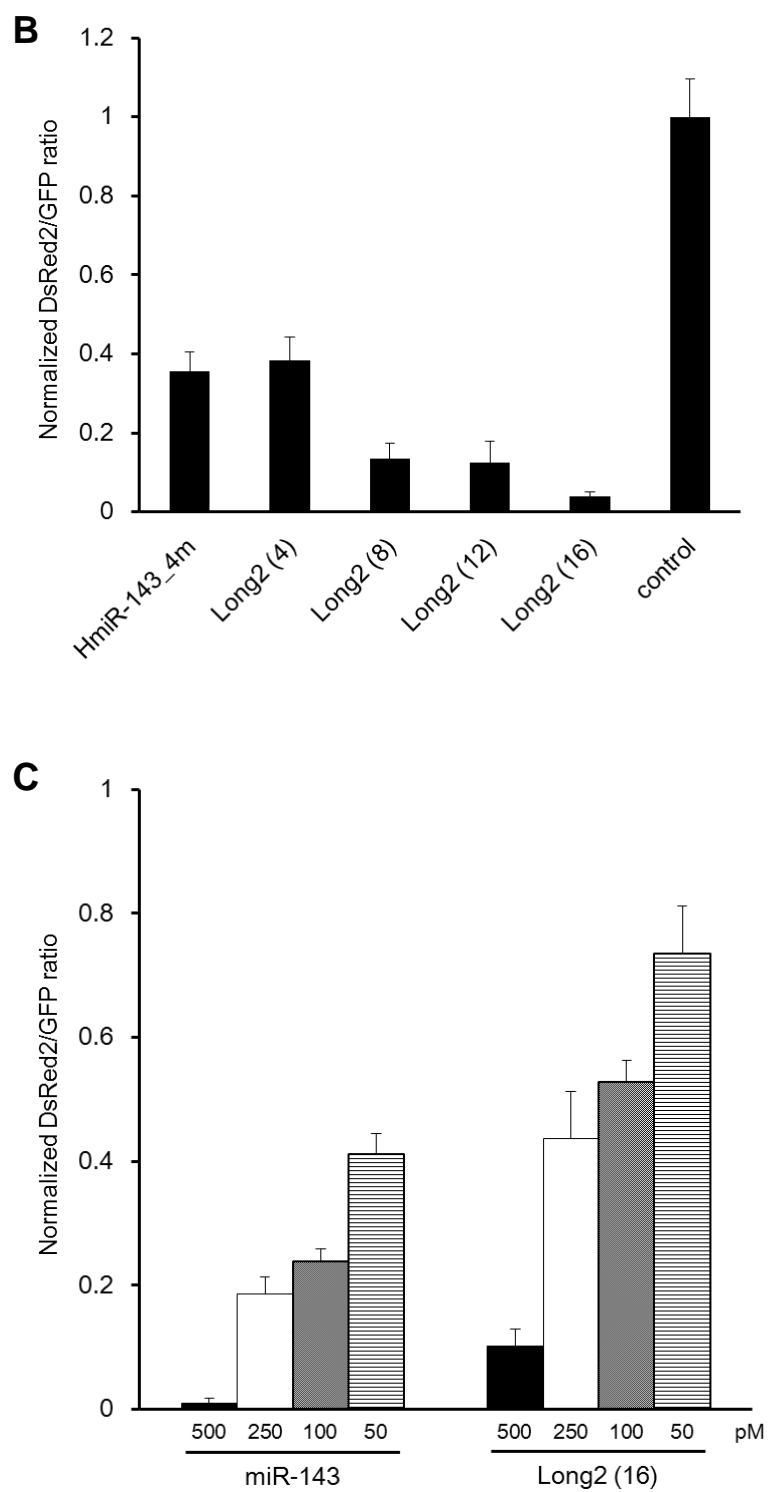
**Table 5-2.** 延長型 HmiR-143 の延長領域の配列

Name of HmiRNA	5' flanking sequence of miDNA* strand(5' - 3')
Long1 (12)	GGAGAGGGAGAG
Long2 (16)	GCGTAGGCGTTGGAGC
Long3 (14)	GCGTAGGCAAGAGT
Long4 (17)	CCTGAAGTTCATCTGCA
Long5 (17)	TTGAAGTCCCAGTCGAA
Long2 (4)	GCGT
Long2 (8)	GCGTAGGC
Long2 (12)	GCGTAGGCGTTG

括弧内の数字は延長領域の塩基数を表している。

**Fig 5-4.** 延長領域の配列が活性に与える影響

(A) ランダムな延長配列をもつ延長型 HmiR-143 の活性を比較した。サンプル濃度は 500 pM に合わせた。(B) Long2 の延長領域の長さとの関係を調べた。サンプルの濃度は 2 nM に合わせた。(C) miR-143 と Long2(16)の活性を 4 段階の濃度において比較した。



**Fig 5-4 続き**

め、異なる長さの延長領域をもつ Long2 (16)変異体を作製した。これらを延長領域の長さに応じて Long2 (4)、Long2 (8)、Long (12)と名付け、それぞれがもつ延長領域の配列を Table 5-2 に示した。これらの活性をレポータージーンアッセイにより比較したところ、最も短い4塩基長の延長領域を付加した Long2 (4)の活性は HmiR-143\_4m の活性と同等であり、延長配列の付加による活性の改善は見られなかった (Fig 5-4 B)。しかし、8塩基長または12塩基長の延長領域を付加した Long2 (8)および Long2 (12)は HmiR-143\_4m よりも高い活性を示した。そして、Long (12)よりも4塩基分長い延長領域をもつ Long (16)がより高い活性をもつことから、延長領域の長さに依存して活性が向上していることを確認できた。Fig 5-4Cの結果から、Long2(16)は天然型 miR-143 には劣るものの高い活性を有していることが確認された。

### 5-3-3. 延長領域の付加による miR-143 の高活性化

延長型 HmiR-143\_4m の活性は miR-143 よりも低く、合成コストが低いとはいえ実用的ではない。次に、ヘテロ化を行わず2本鎖RNAに対して延長領域を付加した延長型 miR-143 を設計した。miR-143 は抗腫瘍活性を示すものの、その程度は決して高いと言えない。延長化によって miR-143 の活性を高めることに成功すれば、より効率の良い腫瘍増殖抑制が可能になる。

作製した延長型 miR-143 を Fig 5-6A に示す。延長配列は HmiR-143 と同様の配列を持つ2本鎖RNAである miR-143\_4m に付加した。143\_4m\_GGA12 は、5-3-2 で述べた Long1 を基に、全ての塩基をRNAで設計したものである。143\_4m\_long は同じ実験で最も高い活性を示した Long2(16)を基に設計したものである。上記2つの延長型 miR-143 は、延長領域の塩基も全てRNAで構成されているが、これらの延長領域を全てRNAからDNAに置き換えたキメラ延長型 miR-143 も併せて作製した。それぞれの核酸を 143\_4m\_GGA12\_chimera、143\_4m\_long\_chimera と表記する。それらに加えて、天然型 miR-143 をミスマッチの位置は変えず、両末端を平滑末端にした 143\_blunt を作製した。そして、143\_blunt に延長配列を付加した 143\_blunt\_GGA12、143\_blunt\_GGA12\_chimera を併せて作製した。活性の比較はレポータージーンアッセイにより行った。

Fig 5-6B に示すように、延長配列を有しない 143\_4m が、すでに 143\_mature よりも高い活性を示していた。miR-143\_4m にRNA延長領域を付加した 143\_4m\_GGA12、143\_4m\_long は共に活性が向上し、143\_mature を上回る活性を示した。HmiRNA を用いた実験の結果と同様に、143\_4m\_long は 143\_4m\_GGA12 よりも高い活性を示した。さらに興味深いことに延長領域をDNAに置換したキメラ延長型 miR-143 は、それぞれ基となったRNA延長型 miR-143 よりも高い活性を持つことが明らかになった。143\_4m\_long\_chimera は今回設計した miR-143 変異体の中で最も高い活性を示し、その活性は 143\_mature の活性を大きく上回るものであった。また天然型 miRNA と同様に4つのミスマッチ塩基をもつ miR-143\_blunt に対して延長領域を付加した 143\_blunt\_GGA12、143\_blunt\_GGA12\_chimera は 143\_blunt よ

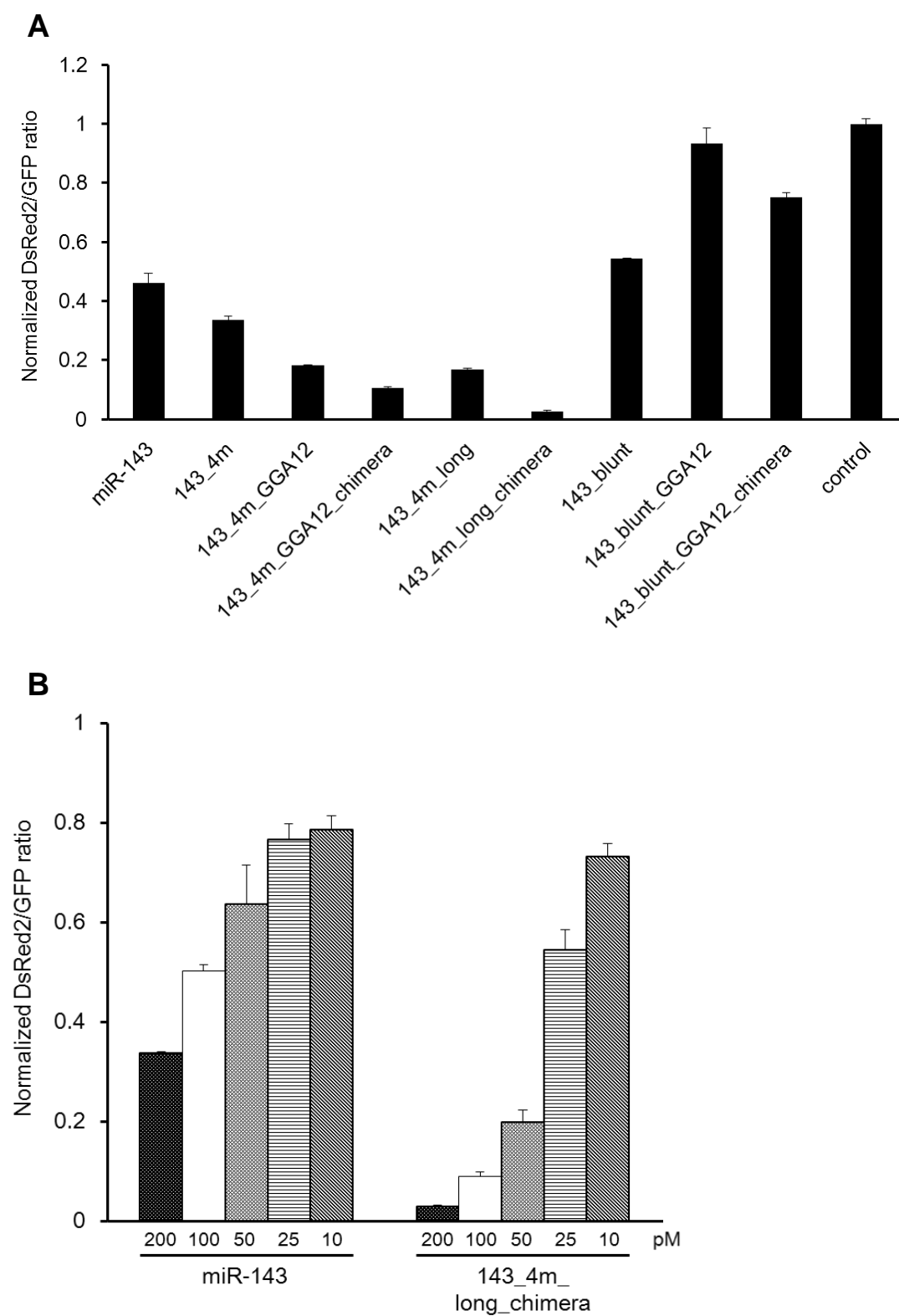
**Table 5-3.** 延長型 miR-143 の配列と構造

miR-143	3' - cucgaugucacgaaguagagu - 5' 5' - g <sub>g</sub> u <sub>g</sub> cagugcu <sub>a</sub> caucuc <sub>u</sub> ggu - 3'
143_4m	3' - cucgaugucacgaaguagagu - 5' 5' - gag <sub>g</sub> uacagugcuucaucuca - 3'
143_4m_GGA12	3' - cucgaugucacgaaguagagu - 5' 5' - ggagagggagaggag <sub>g</sub> uacagugcuucaucuca - 3'
143_4m_GGA12_chimera	3' - cucgaugucacgaaguagagu - 5' 5' - GGAGAGGGAGAGgag <sub>g</sub> uacagugcuucaucuca - 3'
143_4m_long	3' - cucgaugucacgaaguagagu - 5' 5' - gcguaggcguuggagcgag <sub>g</sub> uacagugcuucaucuca - 3'
143_4m_long_chimera	3' - cucgaugucacgaaguagagu - 5' 5' - GCGTAGGCGTTGGAGCgag <sub>g</sub> uacagugcuucaucuca - 3'
143_blunt	3' - cucgaugucacgaaguagagu - 5' 5' - gag <sub>g</sub> u <sub>g</sub> cagugcu <sub>a</sub> caucuc <sub>u</sub> - 3'
143_blunt_GGA12	3' - cucgaugucacgaaguagagu - 5' 5' - ggagagggagaggag <sub>g</sub> u <sub>g</sub> cagugcu <sub>a</sub> caucuc <sub>u</sub> - 3'
143_blunt_GGA12_chimera	3' - cucgaugucacgaaguagagu - 5' 5' - GGAGAGGGAGAGgag <sub>g</sub> u <sub>g</sub> cagugcu <sub>a</sub> caucuc <sub>u</sub> - 3'

りも低い活性を示した。このことから、やはり延長領域付近以外に存在するミスマッチ塩基は、延長領域の付加による活性促進効果を妨げることが確認された。そして、これら 2 つの延長型 miR-143 においても、DNA 延長領域をもつ miR-143\_GGA12\_chimera が、RNA RNA 延長領域をもつ miR-143\_GGA12 よりも高い活性を示した。

#### 5-3-4. キメラ延長型 miR-143 のがん細胞増殖抑制効果

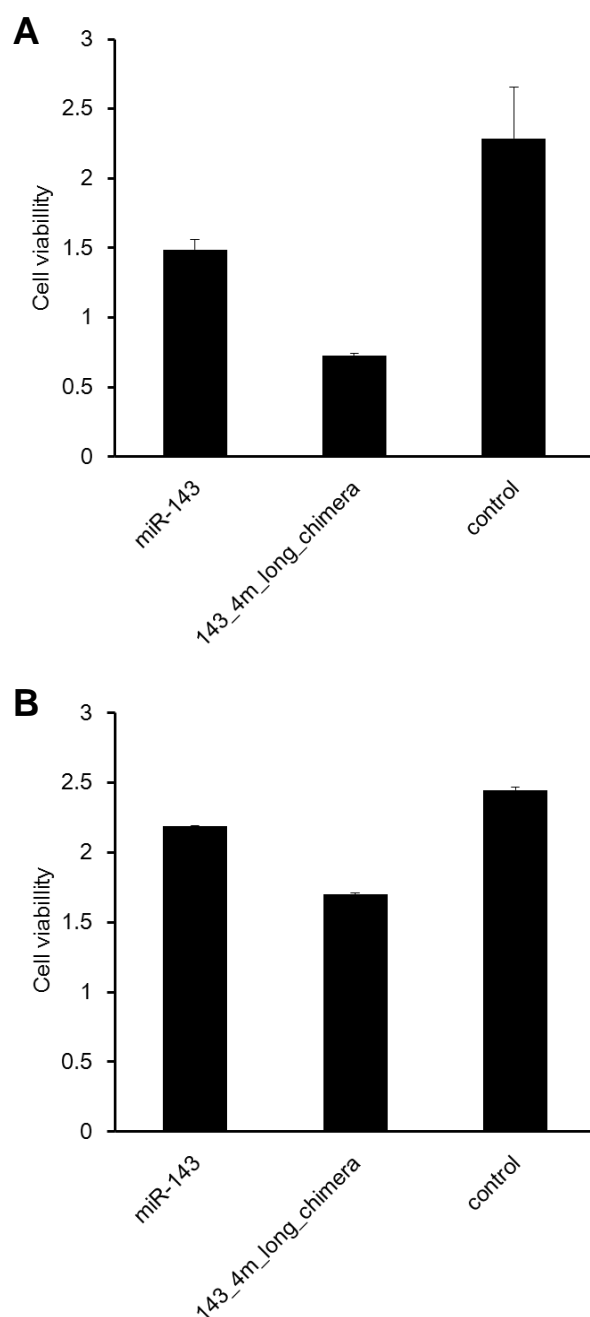
冒頭で述べたとおり、miR-143 は多くのがん細胞株に対して抗腫瘍活性を持つことで知られている。これまでの実験で得られた 143\_4m\_long\_chimera はレポータージーンアッセイにおいて、天然型 miR-143 を大きく上回る活性を示した。このことから、143\_4m\_long\_chimera は極めて高い抗腫瘍活性を有することが期待される。ここでは、HeLa S3、MIA PaCa-2 という 2 種類のがん細胞株に対する 143\_4m\_long\_chimera の増殖抑制効果を検証した。



**Fig 5-5.** 各延長型 miR-143 の活性測定

(A) 各延長型 miR-143 の活性をレポータージーンアッセイにより測定した。サンプル濃度は 100 pM に合わせた。(B) miR-143 と 143\_4m\_long\_chimera の活性を濃度依存的に比較した。

各細胞に miR-143、143\_4m\_long\_chimera、control siRNA のいずれかをトランスフェクションし、2 日後の細胞生存率を WST-assay により測定した。予想していた通り、どちらの細胞に対しても miR-143 は低い細胞増殖抑制効果しか示すことが出来なかった。一方、本章で作製した 143\_4m\_long\_chimera は、どちらの細胞に対しても高い細胞増殖抑制効果を示した (Fig 5-6A、B)。



**Fig 5-6.** 延長型 miRNA を用いたがん細胞増殖抑制

HeLa S3 (A)または MIA PaCa-2 (B)に対して各 2 本鎖核酸を 40 nM の濃度で導入し、WST assay により 2 日後の細胞生存率を測定した。



## 5-4. 考察

本章では、がん細胞に対して増殖抑制能をもつ miR-143 の高活性化に取り組んだ。初めに miR-143\*鎖を全て DNA で置換した HmiR-143 を作製した(Fig 5-2)。そして、ミスマッチ塩基の導入および延長領域の付加による HmiR-143 の高活性化を行った。Fig 5-3 において示されたように、延長領域の付加によって HmiRNA の活性を高めるためには、HmiR-143\_4m のように延長領域に近い位置にミスマッチ塩基をもつことが必要であることが分かった。また、HmiR-143\_4-12m、HmiR-143\_4-18m、HmiR-143\_12-18m のような離れた 2 つの位置にミスマッチ塩基を含むものに対して延長領域を付加した場合、活性が大幅に低下することが明らかになった。

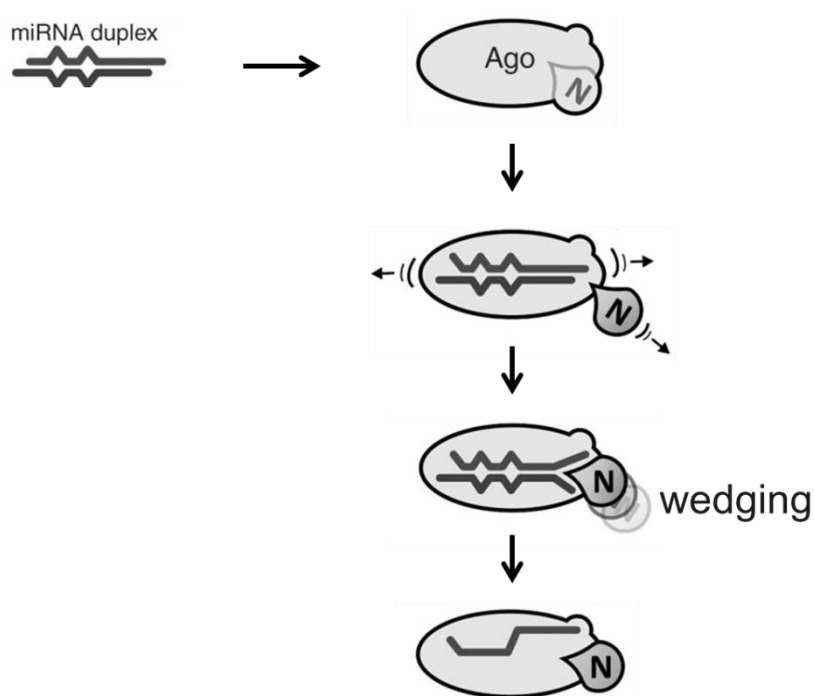
Fig 5-4B に示すように、HmiR-143\_4m に Grich 配列で構成される延長領域を付加した Long2(16)は本章で作製した HmiR-143 変異体の中で最も高い活性を示した。しかしながら、その活性は天然型 miR-143 より低いものであった。第 4 章でも述べたように、2 本鎖 RNA 結合タンパク質である TRBP および PACT が siRNA や miRNA の RISC への取り込みを促進することが知られている。HsiRNA および HmiRNA は 2 本鎖 RNA 領域をもたないため、これらのタンパク質に認識されないため、RISC への取り込み効率が 2 本鎖 RNA である siRNA や miRNA よりも低く、それに伴い翻訳阻害活性も低下する。DNA 置換による活性低下の度合いは 2 本鎖領域の配列により異なり、大きく活性が低下するものもあれば、ほとんど活性が変化しないものもある。第 4 章で用いた HsiPol のように、DNA 置換によって活性があまり低下しないものであれば、ミスマッチ導入と延長領域付加を組み合わせる事により 2 本鎖 RNA である HsiPol と同等の活性を与える事が出来る。しかし、本章で用いた HmiR-143 は DNA 置換による活性の低下が著しく、ミスマッチ導入と延長領域付加を行った場合にも、miR-143 より低い活性しか示さなかった。

miRNA\*鎖の DNA 置換を行わず、2 本鎖 RNA である miR-143\_4m に対して延長領域を付加した場合にも活性の向上を確認した。そして、本章で作製した延長型 miR-143 の中で最も高い活性をもつ 143\_4m\_long\_chimera は、天然型の miR-143 よりも高いがん細胞増殖性効果を示した(Fig 5-6)。これらの結果から、本章において創製したキメラ延長型 miR-143 は非常に優れたがん治療薬となる可能性があると言える。

ここまで述べたように、Grich 配列をもつ延長領域を付加することで HmiRNA および miRNA の活性が飛躍的に向上した。しかしながら、延長領域がどのような仕組みでこれらの活性を高めているのかは不明である。ここでは、現時点で得られているデータを基に延長領域の作用機構について仮説を立てた。Kwak らは unwinding によって miRNA/miRNA\*2 本鎖が 1 本鎖化される際に、Fig 5-7 に示す wedging と呼ばれる機構が関与していると報告した(Fig 5-7)。wedging とは、Ago2 に取り込まれた miRNA/miRNA\*2 本鎖の末端領域に Ago2 の N 末端ドメインを食い込ませる反応を表している。Kwak らは wedging の機能をもたない Ago2 変異体を用いた実験によって、wedging が miRNA/miRNA\*2 本鎖の unwinding が効率

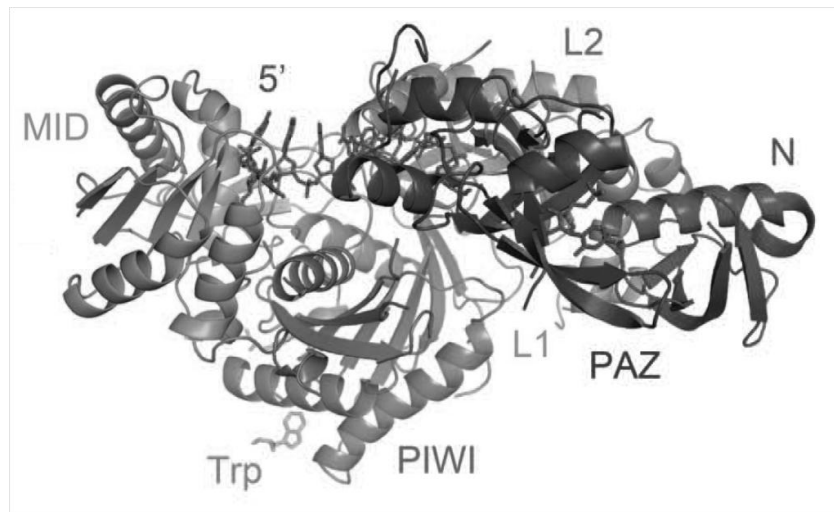
よく起こるために必須の反応であることを示した。Nicole らが解明した miRNA-Ago2 複合体の立体構造(18)から、Ago2 に取り込まれた延長型 miRNA の 5'延長領域は、Ago2 の N 末端領域付近に存在すると予測される(Fig 5-8)。これらのことから、延長型 miRNA の 5'延長領域が Ago2 の N 末端領域と相互作用することで、wedging の効率が高められているのではないかと推察した(Fig 5-9)。延長領域におけるグアニン含有量の上昇によって、延長型 miR-143 の活性が向上したことから、延長領域中のグアニンが N 末端ドメインと親和性をもつことが示唆される。つまり、キメラ延長型 miR-143 の高活性は、延長領域が Ago2 の N 末端ドメインと相互作用することで wedging を促進し unwinding 効率が高まることによって得られていると考えている。Fig 5-5A に示したように、延長領域が DNA である方が高い活性促進効果が得られた。この原因として、DNA の方が細胞内において安定にしていること、DNA のグアニンが RNA のグアニンよりも強く Ago2 の N 末端ドメインと相互作用することなどが考えられるが、こちらについても理由は明らかでない。

本研究で開発した延長領域の付加による miRNA の高活性化法は、miR-143 に限らずあらゆる miRNA に応用できると考えている。miR-22<sup>(11-13)</sup>や miR-34<sup>(14-16)</sup>など抗腫瘍活性を示す miRNA は数多く報告されている。これらの miRNA に対してキメラ延長型 miRNA を作製することが、有効な抗がん剤の創製につながると期待している。



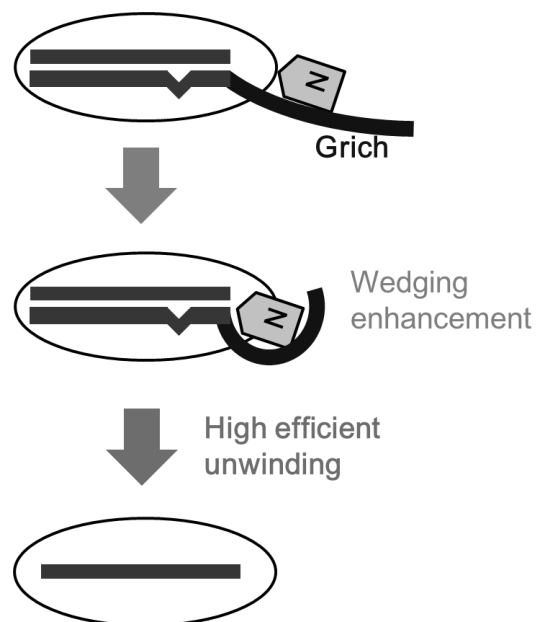
**Fig 5-7.** Kwak らが示した wedging 機構の概念図

Ago2 に取り込まれた miRNA2 本鎖が、Ago2 の N 末端ドメインからの wedging を受けることで、unwinding による 1 本鎖化が促進される。



**Fig 5-8.** Human Ago2 の立体構造

Ago2 は N 末端ドメイン、PAZ ドメイン、PIWI ドメイン、MID ドメインによって構成されている。



**Fig 5-9.** 延長領域と N 末端ドメインの相互作用

延長型 miRNA が RISC に取り込まれると、Ago2 の N 末端ドメインと延長領域の相互作用が起こる。その結果、N 末端ドメインによる wedging が促進され unwinding が効率よく行われる。

## 5-5. 参考文献

1. **Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., and 8 authors:** A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2257-2261 (2006).
2. **Hydbring, P. and Badalian-Very, G.:** Clinical applications of microRNAs. *F1000Research*, **2**, 136 (2013).
3. **Kota, J., Chivukula, R. R., O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Montgomery, C. L., Hwang, H. W., Chang, T. C., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K. R., and other 2 authors:** Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*, **137**, 1005-1017 (2009).
4. **Takeshita, F., Patrawala, L., Osaki, M., Takahashi, R. U., Yamamoto, Y., Kosaka, N., Kawamata, M., Kelnar, K., Bader, A. G., Brown, D., and other 1 author:** Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther*, **18**, 181-187 (2010).
5. **Michael, M. Z., SM, O. C., van Holst Pellekaan, N. G., Young, G. P., and James, R. J.:** Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, **1**, 882-891 (2003).
6. **Borrallho, P. M., Kren, B. T., Castro, R. E., da Silva, I. B., Steer, C. J., and Rodrigues, C. M.:** MicroRNA-143 reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. *Febs J*, **276**, 6689-6700 (2009).
7. **Kent, O. A., Chivukula, R. R., Mullendore, M., Wentzel, E. A., Feldmann, G., Lee, K. H., Liu, S., Leach, S. D., Maitra, A., and Mendell, J. T.:** Repression of the miR-143/145 cluster by oncogenic Ras initiates a tumor-promoting feed-forward pathway. *Genes Dev*, **24**, 2754-2759 (2010).
8. **Noguchi, S., Mori, T., Hoshino, Y., Maruo, K., Yamada, N., Kitade, Y., Naoe, T., and Akao, Y.:** MicroRNA-143 functions as a tumor suppressor in human bladder cancer T24 cells. *Cancer Lett*, **307**, 211-220 (2011).
9. **1. Xu, B., Niu, X., Zhang, X., Tao, J., Wu, D., Wang, Z., Li, P., Zhang, W., Wu, H., Feng, N., and other 3 authors:** miR-143 decreases prostate cancer cells proliferation and migration and enhances their sensitivity to docetaxel through suppression of KRAS. *Mol Cell Biochem*, **350**, 207-213 (2010).
10. **Kawamata, T. and Tomari, Y.:** Making RISC. *Trends Biochem Sci*, **35**, 368-376 (2011).
11. **Pandey, D. P. and Picard, D.:** miR-22 inhibits estrogen signaling by directly targeting the estrogen receptor alpha mRNA. *Mol Cell Biol*, **29**, 3783-3790 (2009).

12. **Xu, D., Takeshita, F., Hino, Y., Fukunaga, S., Kudo, Y., Tamaki, A., Matsunaga, J., Takahashi, R. U., Takata, T., Shimamoto, A., and other 2 authors:** miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *J Cell Biol*, **193**, 409-424 (2011).
13. **Guo, M. M., Hu, L. H., Wang, Y. Q., Chen, P., Huang, J. G., Lu, N., He, J. H., and Liao, C. G.:** miR-22 is down-regulated in gastric cancer, and its overexpression inhibits cell migration and invasion via targeting transcription factor Sp1. *Med Oncol*, **30**, 542 (2013).
14. **Ji, Q., Hao, X., Zhang, M., Tang, W., Yang, M., Li, L., Xiang, D., Desano, J. T., Bommer, G. T., Fan, D., Fearon, E. R., Lawrence, T. S., and Xu, L.:** MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS One*, **4**, e6816 (2009).
15. **Wu, J., Wu, G., Lv, L., Ren, Y. F., Zhang, X. J., Xue, Y. F., Li, G., Lu, X., Sun, Z., and Tang, K. F.:** MicroRNA-34a inhibits migration and invasion of colon cancer cells via targeting to Fra-1. *Carcinogenesis*, **33**, 519-528 (2012).
16. **Yang, S., Li, Y., Gao, J., Zhang, T., Li, S., Luo, A., Chen, H., Ding, F., Wang, X., and Liu, Z.:** MicroRNA-34 suppresses breast cancer invasion and metastasis by directly targeting Fra-1. *Oncogene*, **32**, 4294-4303 (2013).
17. **Kwak, PB. and Tomari, Y.:** The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol*, **19**, 145-151 (2012).
18. **Schirle, N. T. and MacRae, I. J.:** The crystal structure of human Argonaute2. *Science*, **336**, 1037-1040 (2012).



第 6 章  
pre-miRNA を標的とした  
siRNA による  
がん細胞選択的増殖抑制

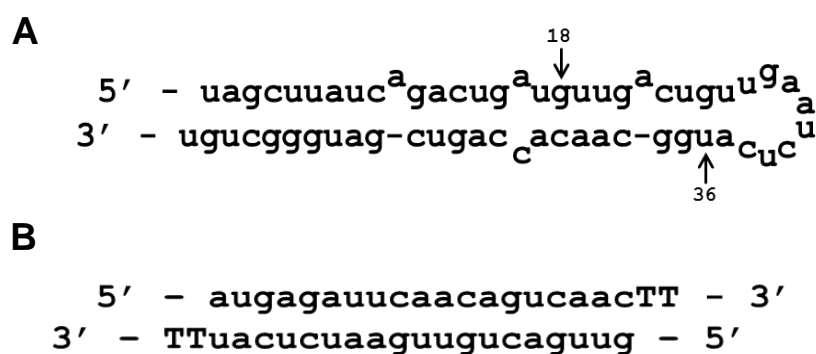
## 6-1. 緒言

あらゆる疾患の発生機構が分子レベルで詳細に解明されつつある現在、疾患の原因となる分子だけに特異的に作用する分子標的薬の開発が急速に進んでいる<sup>(1-3)</sup>。これまで主流であった低分子医薬は網羅的スクリーニングによって生み出されたものがほとんどであり、詳細な作用機構が知られないまま使用されているものが多く存在する。そのため生体内で予期せぬ働きをし、重篤な副作用を引き起こしてしまう危険性があった。一方、分子標的薬は標的とする分子が定まっており薬剤の作用機構も明らかであるため、予期せぬ副作用が起きる可能性が低いとされている。現在最も開発が盛んな分子標的薬は抗体医薬であり、次々に有効な医薬が生み出されている<sup>(4,5)</sup>。そして抗体医薬に続く、次世代の分子標的薬として期待を集めているのが siRNA 医薬である<sup>(6)</sup>。

siRNA は塩基配列を変えるだけで、細胞内のあらゆるタンパク質の発現を調節できる<sup>(7,8)</sup>。抗体は巨大な分子であり細胞内への導入が難しいため、現在の抗体医薬は細胞表面タンパクを標的としたものがほとんどである。細胞内のタンパク質も標的に出来る siRNA 医薬が実現すれば、よりバラエティーに富んだ分子標的薬の開発が可能になる。細胞の生存に必須なタンパク質を標的とした細胞致死性 siRNA なども知られており<sup>(9)</sup>、これらを用いることで、がん細胞を死滅させ腫瘍の増殖を抑制する事も可能である。しかし現在の DDS 技術では、これら細胞致死性 siRNA を腫瘍組織選択的に届けることは難しく、正常細胞の増殖を抑制し思わぬ副作用を引き起こす可能性がある。このことから正常細胞の生存には関わらず、がん細胞の生存にのみ大きく関与する因子を標的とすることが望まれる。

siRNA を用いたがん細胞選択的な増殖抑制を実現するため、がんの形成に大きく関与することが明らかになっている miR-21<sup>(10,11)</sup>に着目した。しかし、1 本鎖となり RISC に取り込まれた後の miRNA を siRNA の標的とすることは事実上極めて難しい。そこで、miR-21 の前駆体である pre-miR-21 (Fig 6-1A)に対する siRNA を作製しノックダウンすることにより、がん細胞における miR-21 の生合成を阻害し、細胞増殖抑制効果を得られないかと考えた。miR-21 は正常細胞においてほとんど発現がみられず<sup>(13,14)</sup>、正常細胞の機能維持にはあまり関わっていないことが推察される。つまり pre-miR-21 がノックダウンされれば、がん細胞選択的な増殖抑制が可能になると期待できる。また一般的に siRNA の標的は mRNA であると考えられているため、本手法の有効性を示すことが出来れば、siRNA を応用できる幅が飛躍的に広がるきっかけになると考えた。





**Fig 6-1.** pre-miR-21 および、それを標的とする siRNA の構造と配列

(A) pre-miR-21 の構造と配列を示した<sup>(15)</sup>。(B) si-pre21 の構造と配列を示した。上側の鎖がガイド鎖を、下側の鎖がパッセンジャー鎖を示している。si-pre21 は pre-miR-21 の 18 番目から 36 番目の塩基を標的とするよう設計されている。小文字は RNA、大文字は DNA を表している

## 6-2. 材料と方法

### 6-2-1. 細胞培養

ヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞およびヒト子宮頸がん由来 HeLa S3 細胞は、10% ウシ胎児血清(FBS) (CCB)、100 units/mL penicillin G (Wako)および 100 µg/mL streptomycin (Wako)添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wako)を用いて培養した。

### 6-2-2. siRNA の調製

使用した RNA の化学合成は全て Sigma 社に依頼した。第 4 章と同様の手順でアニーリングを行い 2 本鎖を形成した。

### 6-2-3. pre-miRNA および mature miRNA の定量

第 4 章と同様の手順で HeLa S3 細胞に核酸を導入した。2 日後に培養上清を除き、Trizol (Invitrogen)を用いて全 RNA を抽出した後、イソプロパノール沈殿法により全 RNA を単離・精製した。得られた全 RNA から PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara)を用いて cDNA を合成した。この際に、キットに含まれるプライマーを用いて全 cDNA を、標的特異的なプライマーを用いて pre-miR-21 および mature miR-21 由来の cDNA を取得した。qRT-PCR 法により各 RNA の定量を行った。pre-miR-21 および GAPDH の検出には SYBR Premix Ex Taq (Takara)を使用し、mature miR-21 の検出には FastStart Universal Probe master (Roche)を使用した。各遺伝子の検出に用いたプライマーの配列を Table 6-1 に示す。

**Table 6-1.** qRT-PCR で使用したプライマーの配列

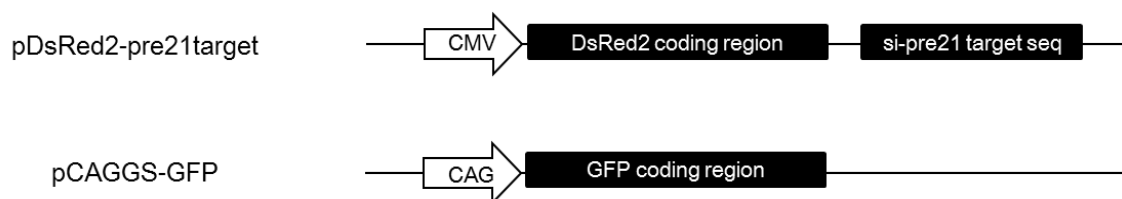
Name of primer	Sequence (5' - 3')
pre21-RT	ACAGCCCATCGAC
pre21-right	TAGCTTATCAGACTGATGTTGAC
pre21-left	ACAGCCCATCGACTGG
mature21-RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTTCGCACCAGAGCCAACCTCAACA
mature21-right	GCCCGCTAGCTTATCAGACTG
mature21-left	GTGCAGGGTCCGAGGT
GAPDH-right	TCCCATCACCATCTTCCA
GAPDH-left	CATCACGCCACAGTTTCC

#### 6-2-4. 細胞増殖測定

細胞生存率の測定は第 5 章と同様の手順で行った。結果は同様の実験を 3 回実施した平均値で示した。

#### 6-2-5. レポータージーンアッセイ

第 5 章と同様の手順でレポータージーンアッセイを行った。pDsRed2-C1 のもつ DsRed2 遺伝子の 3'-UTR に、si-pre21 の標的配列を組み込んだ pDsRed2-pre21target を活性測定に使用した(Fig 6-2)。結果は同様の実験を 3 回実施した平均値で示した。

**Fig 6-2.** レポーター遺伝子の構成

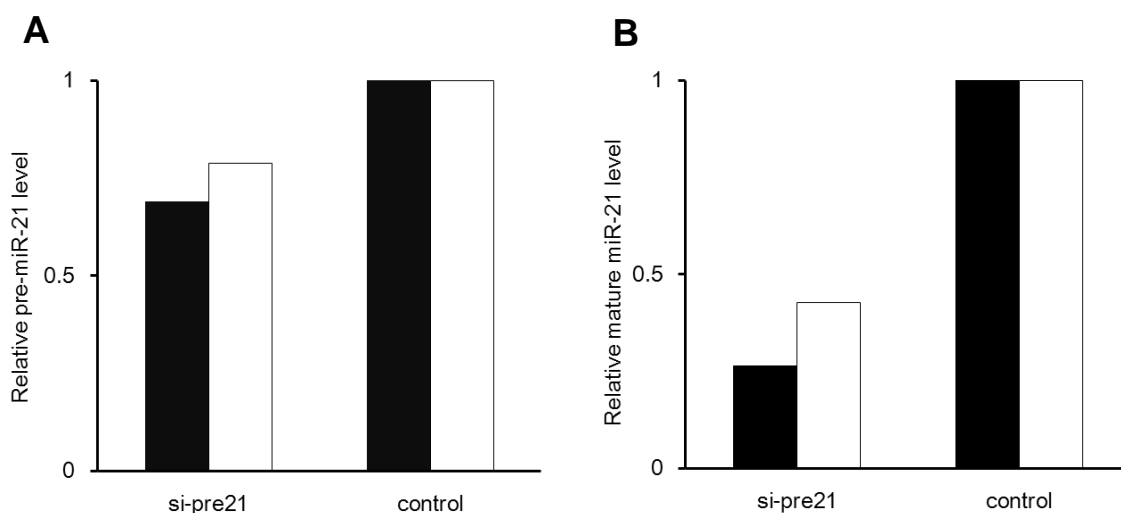
DsRed2 遺伝子の 3'-UTR に si-pre21 の標的配列が含まれている。DsRed2 mRNA は CMV プロモーターから、GFP mRNA は CAG プロモーターから転写される。

## 6-3. 結果と考察

### 6-3-1. pre-miR-21 のノックダウンによるがん細胞増殖抑制

miR-21 生合成経路の停止を目的として、miR-21 の前駆体である pre-miR-21 に対する siRNA の設計を行った。siRNA の働きによって pre-miR-21 が分解されることにより、成熟型 miR-21(mature miR-21)産生量の減少が期待される。pre-miR-21 の構造は Fig 6-1A に示すとおりであり、作成した siRNA (si-pre21)は pre-miR-21 のステムループ領域を標的として設計されている(Fig 6-1B)。本章においては、現在最も一般的に使用されている両 3'末端に 2 塩基の突出したチミンをもつ siRNA を使用した。

si-pre21 による pre-miR-21 および mature miR-21 の発現抑制効果について検討した。がん細胞モデルとして HeLa S3 細胞を用いた。si-pre21 を HeLa S3 細胞に導入し、2 日後の



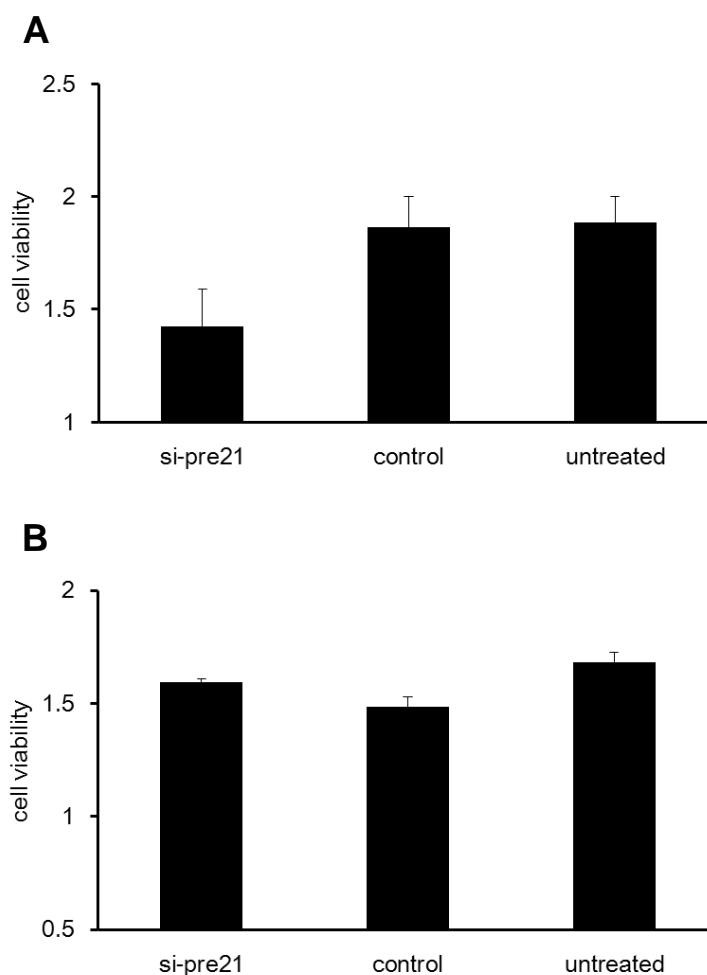
**Fig 6-3.** si-pre21 による pre-miR-21 および mature miR-21 の発現抑制

HeLa S3 細胞に対して si-pre21 を導入し、mature miR-21 (A)および pre-miR-21 (B)の発現量を定量 PCR 法により測定した。サンプル濃度は(■) 20 nM、(□) 10 nM に合わせた。

pre-miR-21 量および mature-miR-21 量を qRT-PCR 法により測定した。Fig 6-3A に示すように、si-pre21 の導入によって HeLa S3 細胞内の pre-miR-21 発現量が減少した。また pre-miR-21 がノックダウンされたことで、下流の mature miR-21 の発現量も同じく減少していることが確認された。これらのことから、siRNA を用いた pre-miRNA のノックダウンは mature miRNA の産生を阻害する有効な方法であると言える。

緒言で述べたように miR-21 はがん細胞の形成に大きく関わっているため、si-pre21 を用いて mature miR-21 の発現量を低下させることで、がん細胞の増殖を抑制できると期待され

る。HeLa S3 細胞に対して si-pre21 の導入し、2 日後における HeLa S3 細胞の生存率を WST assay を用いて測定した、Fig 6-4A に示すとおり、si-pre21 を導入した場合に HeLa S3 細胞の増殖が抑制された。このことから、si-pre21 のがん細胞に対する増殖抑制能を確認できたので、続けて si-pre21 のがん細胞に対する選択性について検証を行った。miR-21 は、がん細胞において過剰に発現する miRNA であるため、正常細胞の形成にあまり関与していないと推察される。正常細胞モデルとして miR-21 の発現量が低いことで知られる HEK293T 細胞を用いた<sup>(16)</sup>。si-pre21 を HEK293T 細胞に導入し、WST assay により 2 日後における細胞生存率を測定した。予想していたように、si-pre21 を導入した場合においても HEK293T 細胞の増殖に変化は見られなかった(Fig 6-4B)。このことから si-pre21 はがん細胞選択的な増殖抑制効果を有する優れた分子標的薬候補であると言える。



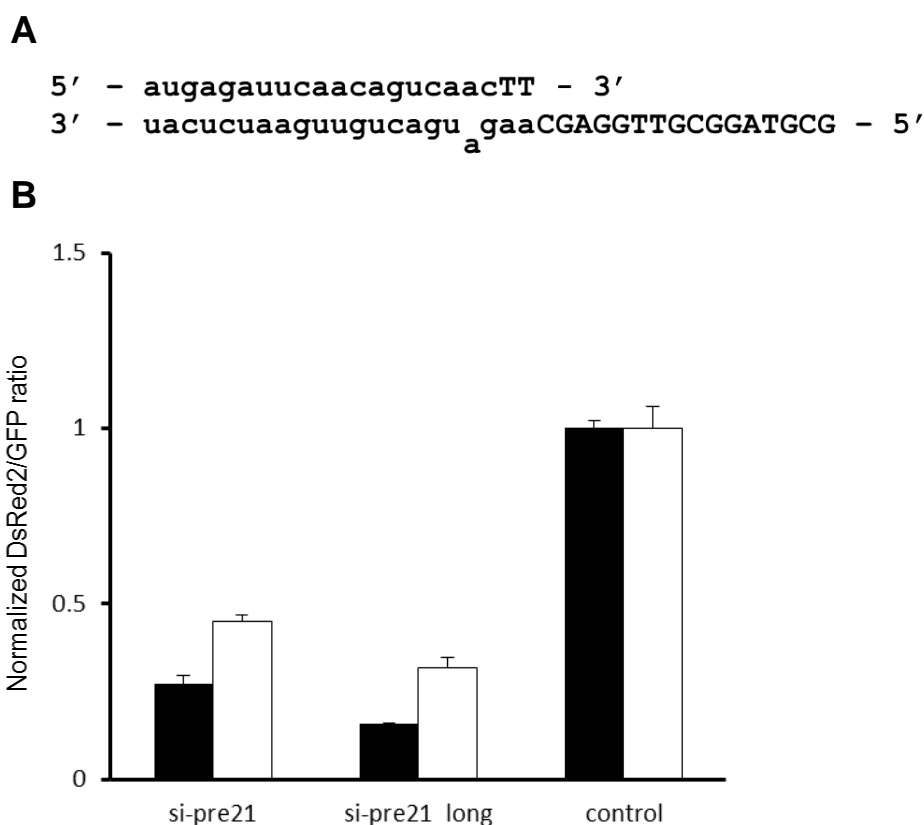
**Fig 6-4.** si-pre21 の導入によるがん細胞および正常細胞の生存率への影響

HeLa S3 細胞(A)もしくは HEK293T 細胞(B)に対し 20 nM の si-pre21 を導入し、WST assay により 2 日後の細胞生存率を測定した。

### 6-3-2. 延長型 si-pre21 による高効率ながん細胞増殖抑制

第4章及び第5章において、HsiRNA または miRNA の末端に Grich 延長配列を付加することで活性が高まることを示した。本章では、がん細胞増殖抑制効果をもつ si-pre21 に対して Grich 延長配列の付加を行うことで活性高め、より効率良くがん細胞の増殖を抑制することを目指した。作製した延長型 siRNA の構造は Fig 6-5 A に示すとおりであり、これを si-pre21\_long と名付けた。si-pre21 は 2 本鎖 RNA 領域に 1 つのミスマッチ塩基、パッセンジャー鎖の 5'末端に Grich な DNA 延長領域を有している(Fig 6-5A)。

レポータージーンアッセイを行うことにより、si-pre21 と si-pre21\_long の活性を比較した。用いたプラスミドは活性測定用の pDsRed2-pre21target および導入効率補正用の pCAGGS-GFP である。pDsRed2-pre21target は DsRed2 遺伝子の 3'-UTR に si-pre21 のターゲット配列が組み込まれている。これらのプラスミドと活性を測定する siRNA を同時に HEK293T 細胞へ導入した。48 時間後に細胞を溶解し、蛍光量を測定することにより得た DsRed2/GFP の値を基に活性の比較を行った。Fig 6-5B に示すように、新たに設計した si-pre21\_long は si-pre21 よりも効率よく DsRed2 の発現を抑制し高い活性を示した。

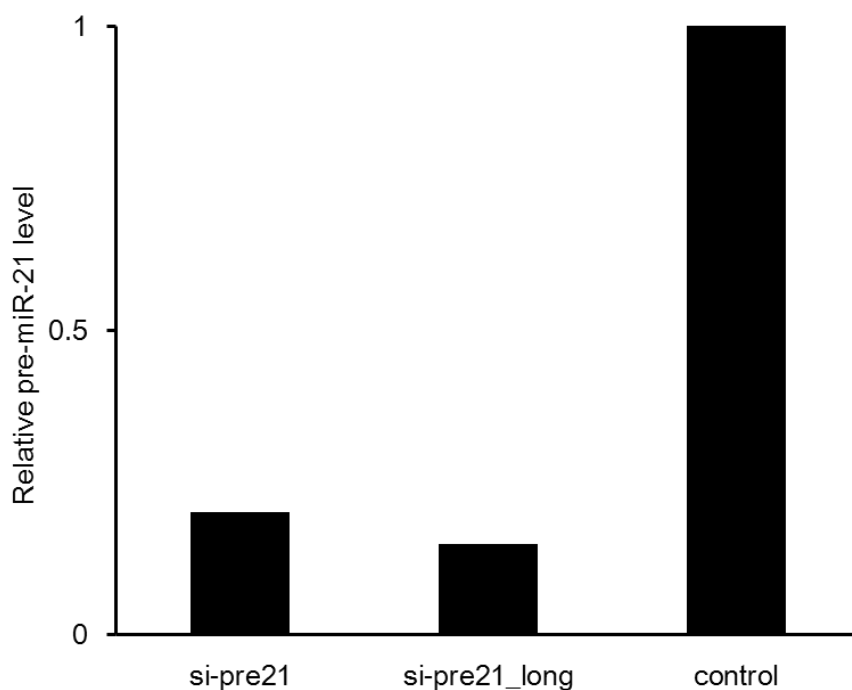


**Fig 6-5.** レポータージーンアッセイによる延長型 siRNA の活性測定

(A) si-pre21\_long の構造と配列を示した。RNA は小文字、DNA は大文字で示した。(B) si-pre21 と si-pre21\_long の活性を比較した。サンプル濃度は(■) 500 pM、(□) 250 pM に合わせた。

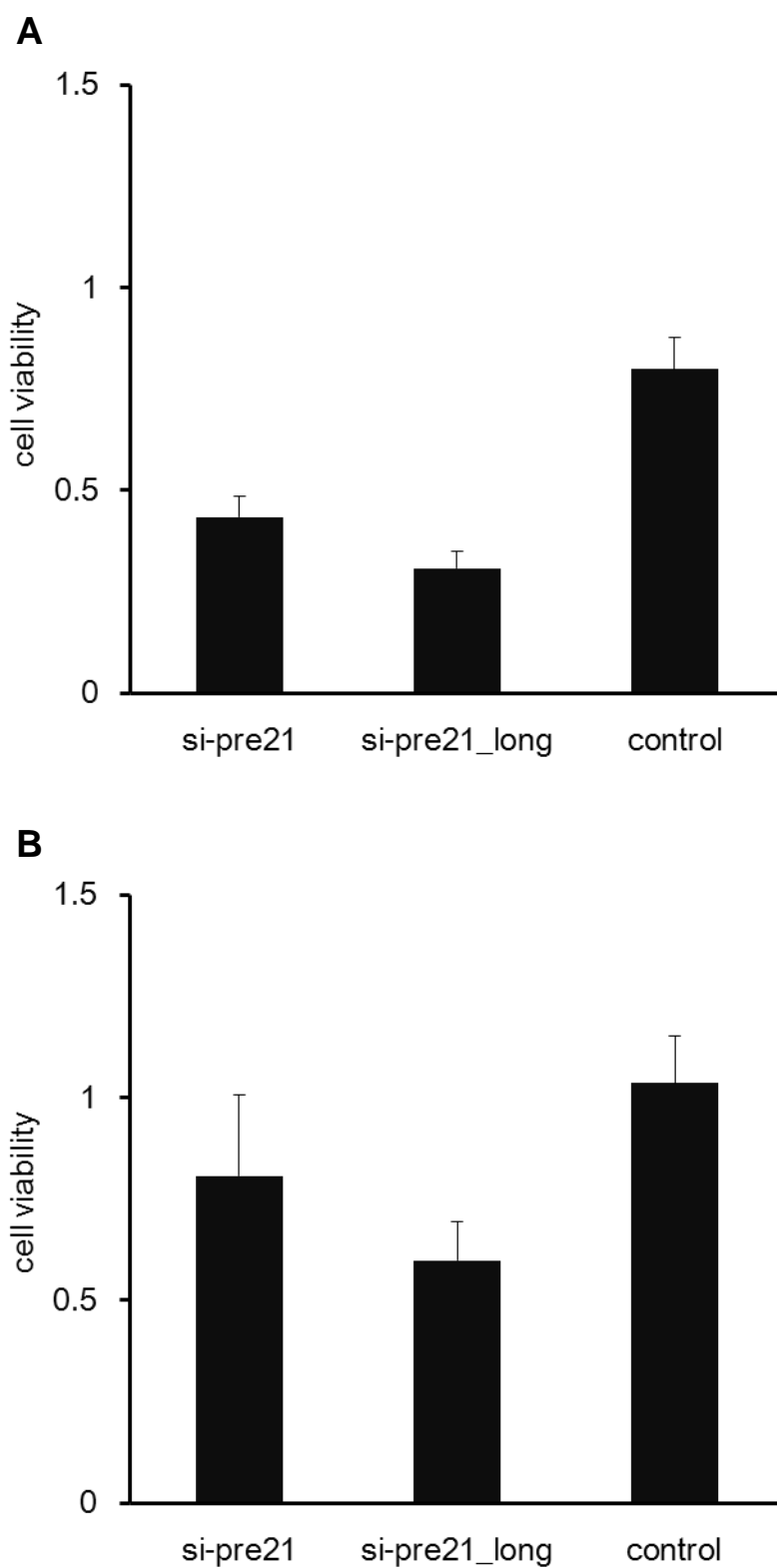
si-pre-21\_long の mature miR-21 産生に対する抑制効果について検証を行った。si-pre21\_long を HeLa S3 細胞に導入し、2 日後の mature miR-21 量を qRT-PCR 法により測定した。Fig 6-6A に示すとおり、si-pre21\_long は si-pre21 よりも僅かではあるが効率よく mature miR-21 の産生を抑制していた。続けて si-pre21\_long のがん細胞増殖抑制効果を調べた。HeLa S3 および MIA PaCa-2 細胞に対して si-pre21\_long を導入し 2 日後における細胞生存率を WST assay により測定した。どちらに細胞に対しても si-pre21\_long は si-pre21 を上回る高い細胞増殖抑制効果を示した(Fig 6A、B)。

siRNA を用いて pre-miRNA のノックダウンを行う手法は、未だあまり知られていない。延長型 siRNA を用いて、様々な pre-miRNA を効率よくノックダウンすることが可能である。また pre-miRNA に限らず細胞内のあらゆる機能性 RNA のはたらきを、延長型 siRNA を用いて制御することが可能になると期待している。



**Fig 6-6.** 延長型 siRNA による mature miRNA の発現阻害

HeLa S3 細胞に対して 20 nM の各二本鎖核酸を導入し、mature miR-21 の発現量を qRT-PCR 法により測定した。



**Fig 6-7.** si-pre21\_long のがん細胞に対する増殖抑制効果

HeLa S3 細胞(A)または MIA PaCa-2 細胞に対して 20 nM の 2 本鎖 RNA を導入し、2 日後の生存率を WST assay により測定した。

#### 6-4. 参考文献

1. **Keiser, M. J., Setola, V., Irwin, J. J., Laggner, C., Abbas, A. I., Hufeisen, S. J., Jensen, N. H., Kuijter, M. B., Matos, R. C., Tran, T. B., and other 7 authors:** Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature*, **462**, 175-181 (2009).
2. **Bai, R. Y., Staedtke, V., and Riggins, G. J.:** Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends Mol Med*, **17**, 301-312 (2011).
3. **Tanaka, T. and Tamura, K.:** Recent Advances in Molecular Targeted Therapy for advanced Colorectal Cancer and Non-Small Cell Lung Cancer. *J Phys Chem Biophys*, **2**,3 (2012)
4. **Weiner, L. M., Surana, R., and Wang, S.:** Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, **10**, 317-327 (2010).
5. **Sliwkowski, M. X. and Mellman, I.:** Antibody therapeutics in cancer. *Science*, **341**, 1192-1198 (2013).
6. **Vaishnav, A. K., Gollob, J., Gamba-Vitalo, C., Hutabarat, R., Sah, D., Meyers, R., de Fougerolles, T., and Maraganore, J.:** A status report on RNAi therapeutics. *Silence*, **1**, 14 (2010).
7. **Shah, J. K., Garner, H. R., White, M. A., Shames, D. S., and Minna, J. D.:** siR: siRNA Information Resource, a web-based tool for siRNA sequence design and analysis and an open access siRNA database. *BMC Bioinformatics*, **8**, 178 (2007).
8. **Naito, Y., Yoshimura, J., Morishita, S., and Ui-Tei, K.:** siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics*, **10**, 392 (2009).
9. **Thaker, N. G., Zhang, F., McDonald, P. R., Shun, T. Y., Lewen, M. D., Pollack, I. F., and Lazo, J. S.:** Identification of survival genes in human glioblastoma cells by small interfering RNA screening. *Mol Pharmacol*, **76**, 1246-1255 (2009).
10. **Zhou, X., Ren, Y., Moore, L., Mei, M., You, Y., Xu, P., Wang, B., Wang, G., Jia, Z., Pu, P., and other 2 authors:** Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status. *Lab Invest*, **90**, 144-155 (2010).
11. **Yan, L. X., Wu, Q. N., Zhang, Y., Li, Y. Y., Liao, D. Z., Hou, J. H., Fu, J., Zeng, M. S., Yun, J. P., Wu, Q. L., and other 2 authors:** Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth. *Breast Cancer Res*, **13**, R2 (2011).



12. **Kwak, P. B., Iwasaki, S., and Tomari, Y.:** The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci*, **101**, 2309-2315 (2010).
13. **Nouraei, N., Van Roosbroeck, K., Vasei, M., Semnani, S., Samaei, N. M., Naghshvar, F., Omid, A. A., Calin, G. A., and Mowla, S. J.:** Expression, tissue distribution and function of miR-21 in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*, **8**, e73009 (2013).
14. **Liu, M., Wu, H., Liu, T., Li, Y., Wang, F., Wan, H., Li, X., and Tang, H.:** Regulation of the cell cycle gene, BTG2, by miR-21 in human laryngeal carcinoma. *Cell Res*, **19**, 828-837 (2009).
15. **Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., and Enright, A. J.:** miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*, **34**, D140-144 (2006).
16. **Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S., and Mo, Y. Y.:** MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res*, **18**, 350-359 (2008).



## 総括

序論で述べたように、miRNA の異常発現が多種多様な疾患の発生に大きく関わるということが明らかになっている。それに伴い、miRNA を標的とした様々な治療薬が提案され実用化に向けて急速に研究が進んでいる。本研究においても、RNA 干渉経路を標的とした新たな機能性核酸を創製し、主のがんの治療を目的として研究を行った。

第2章では、新規 miRNA inhibitor である LidNA の開発について述べた。市販されているものも含め、これまでに開発された miRNA inhibitor のほとんどは化学修飾核酸を用いて合成されたものである。非修飾 DNA からなるアンチセンス核酸は、miRNA に対する親和性が低いため、これまで miRNA inhibitor として使用されることはなかった。本研究において、アンチセンス DNA の両末端に2本鎖領域を付加することにより miRNA への親和性を高め、miRNA inhibitor として使用することに成功した。この非修飾 DNA からなる miRNA inhibitor を LidNA と命名した。レポータージーンアッセイにおいて、LidNA は既存の化学修飾 miRNA inhibitor よりも高い miRNA 阻害活性を有することが示された。

第3章では、2本鎖領域の付加によって一本鎖アンチセンス DNA の結合力が著しく高まる機構について述べた。表面プラズモン共鳴を用いた実験の結果、2本鎖領域が存在することでアンチセンス DNA の標的 DNA への結合力が2000倍にまで高まることが明らかになった。さらに結合解離速度定数の値から、2本鎖領域は標的 DNA の解離抑制に対してほとんど寄与せず、標的 DNA の結合促進に大きく関与していることが示された。また蛍光偏光解析の結果から、1本鎖 DNA に2本鎖領域を付加することで、1本鎖領域の分子運動が大幅に抑制されることが明らかになった。これらのことから、LidNA の2本鎖領域は miRNA 結合領域の分子運動を抑制し、LidNA と miRNA の結合を強く促すはたらきをもつことが証明した。

第4章では、低副作用性 siRNA である HsiRNA の開発について述べた。一般的な siRNA は RNA2 本鎖構造を取るが、HsiRNA は片側の鎖を全て DNA で置換した RNA/DNA2 本鎖構造をとる。HsiRNA は低コストで合成でき副作用の危険性も少ないというメリットをもつが、活性面で siRNA に大きく劣る事が問題となっていた。しかし、本研究において HsiRNA の DNA パッセンジャー鎖に Grich 延長配列を付加することで、著しく活性を高めることに成功した。この延長型 HsiRNA は基となった siRNA と同等の高い活性を示した。また延長型 HsiRNA は siRNA によって強く誘導されるインターフェロン応答反応をほとんど引き起こさないことが明らかになった。

第5章では、高活性型 miRNA の開発について述べた。miR-143 は抗腫瘍活性を有することでよく知られているが、その活性はそれほど強くなかった。そこで第4章で得られた知見を基にして、miRNA\*鎖の5'末端に Grich 延長配列を付加した延長型 miR-143 を作製した。レポータージーンアッセイの結果から、延長型 miR-143 の翻訳抑制活性は天然型 miR-143

のものを上回ることが確認できた。さらに、がん細胞を用いた増殖抑制実験を行ったところ、延長型 **miR-143** は非常に強い抗腫瘍活性を有することが明らかになった。

第 6 章では、**siRNA** を用いたがん細胞選択増殖抑制法について述べた。**miR-21** はがん細胞で過剰に発現している **miRNA** であり、がんの増殖及び転移に深く関与していることが知られている。本研究では、**miR-21** の前駆体である **pre-miR21** を、**siRNA** を用いてノックダウンすることで、**miR-21** の生合成を阻害することに成功した。**si-pre21** は、がん細胞に対しては強い増殖抑制効果を示したが、正常細胞の増殖には一切影響しなかった。また延長型の **si-pre21** を使用したところ、より効率よくがん細胞の増殖を抑制することが可能になった。

本研究において、**RNA** 干渉に関わる非常にユニークな機能性核酸を多数生み出すことに成功した。これらの機能性核酸を組み合わせることで、がんに限らず様々な疾患に対する有効な治療法につながると期待される。

## 論文目録

(公表論文)

1. 第2章

**Tachibana, A., Yamada, Y., Ida, H., Saito, S., and Tanabe, T:** LidNA, a novel miRNA inhibitor constructed with unmodified DNA. FEBS Lett, **586**, 1529-1532 (2012) [査読あり]

2. 第3章

伊田 寛之, 立花 亮, 田辺 利住, “非修飾DNAを用いたmiRNA検出プローブの開発”, 第64回日本生物工学会大会講演要旨集, pp. 226 (2012)

3. 第4章

**Ida, H., Fukuda, K., Tachibana, A., and Tanabe, T.:** Long DNA passenger strand highly improves the activity of RNA/DNA hybrid siRNAs, doi: 10. 1016/j. jbiosc, 1-6 (2013) [査読あり]

4. 第5章

伊田 寛之, 立花 亮, 田辺 利住, “一本鎖DNA領域の付加によるRNAサイレンシング効果の向上”, 第65回日本生物工学会大会トピックス集, pp. 21-22 (2012); 第65回日本生物工学会大会講演要旨集, pp. 163 (2013)

5. 第6章

伊田 寛之, 立花 亮, 田辺 利住, “microRNA ノックダウンによるがん細胞選択的増殖抑制”, 第36回日本分子生物学会年会プログラム集, 1P-0282 (2013)

(公表予定論文)

1. 第3章

**Ida, H., Tachibana, A., and Tanabe, T.:** The binding affinity of ssDNA is improved by attachment of dsDNA regions, J Biosci Bioeng, in contribution. [査読あり]



## 謝辞

本論文の作成にあたり、御指導・御鞭撻を賜りました、大阪市立大学大学院工学研究科・田辺利住教授に心から感謝の意を表します。直接、実験の指導を行って下さいました大阪市立大学大学院工学研究科・立花亮准教授に心より御礼申し上げます。また、有益な御助言とご指導を頂きました、大阪市立大学大学院工学研究科・北村昌也教授、同・立花太郎准教授に心より感謝いたします。

最後に九年間に及ぶ学生生活を、全面的に支援していただいた家族・親戚・友人に心より感謝し、本論文を終わらせていただきます。